



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets

⑪ Numéro de publication:

0 301 961

A1

⑫

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

㉑ Numéro de dépôt: 88401948.0

㉒ Date de dépôt: 27.07.88

㉓ Int. Cl.4: A 61 K 39/002

C 12 N 15/00, A 61 K 39/395,
C 12 P 21/00, G 01 N 33/569

㉔ Priorité: 31.07.87 FR 8710891

㉕ Date de publication de la demande:
01.02.89 Bulletin 89/05

㉖ Etats contractants désignés:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

㉗ Demandeur: INSTITUT PASTEUR
28, rue du Docteur Roux
F-75724 Paris Cédex 15 (FR)

INSTITUT PASTEUR DE LILLE
1, rue du Professeur Calmette BP 245
F-59019 Lille Cédex (FR)

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM)
101, rue de Tolbiac
F-75654 Paris Cédex 13 (FR)

㉘ Inventeur: Capron, André
58, Rue du Cap. Jasmin
F-59133 Phalempin (FR)

Cesbron, Marie-France, née Delauw
46, Rue du Dr. Legay
F-59110 La Madeleine (FR)

Darcy, Françoise
45, Rue Vauban
F-59100 Roubaix (FR)

Pierce, Raymond
23, Rue des Flandres
F-59113 Seclin (FR)

Ridel, Pierre-Richard
3, Allée Louis-Blanc
F-59290 Wasquehal (FR)

㉙ Mandataire: Ores, Irène et al
CABINET ORES 6, Avenue de Messine
F-75008 Paris (FR)

BEST AVAILABLE COPY

㉚ Antigènes d'excrétion-sécrétion spécifiques de *Toxoplasma gondii*, leurs produits d'expression, leurs procédés d'obtention et leurs applications diagnostiques et prophylactiques.

㉛ Antigènes de *Toxoplasma gondii* (TG) constitués par des antigènes d'excrétion-sécrétion (ES) communs aux tachyzoïtes et aux bradyzoïtes de TG et produits de traduction d'ARNm de tachyzoïtes, portant les épitopes reconnus par les antigènes ES précités.

Anticorps polyclonaux et monoclonaux propres à conférer une protection significative contre la Toxoplasmose, sous forme de vaccins, notamment.

Composition thérapeutique pour le traitement de la Toxoplasmose, dont les constituants actifs sont les antigènes ES précités.

Produits de diagnostic de la Toxoplasmose, dont les constituants actifs sont les antigènes ES précités.

EP 0 301 961 A1

Description**ANTIGENES D'EXCRETION-SECRETION SPECIFIQUES DE TOXOPLASMA GONDII, LEURS PRODUITS D'EXPRESSION, LEURS PROCEDES D'OBTENTION ET LEURS APPLICATIONS DIAGNOSTIQUES ET PROPHYLACTIQUES.**

5 La présente invention est relative à l'identification des antigènes excrétés-secrétés par les tachyzoïtes de Toxoplasma gondii (TG) et d'antigènes communs aux tachyzoïtes et aux bradyzoïtes de ce parasite, aux produits de traduction de ces antigènes et aux applications desdits antigènes et produits de traduction, notamment pour l'immunoprotection contre les tachyzoïtes de TG et pour le diagnostic précoce de la toxoplasmose, plus particulièrement de la toxoplasmose congénitale.

10 Le protozoaire parasite Toxoplasma gondii, membre de la classe des Sporozoa et de l'ordre des Coccidia est un parasite intracellulaire qui se reproduit dans une grande variété de types de cellules à l'intérieur de ses hôtes, qui sont des mammifères. Chez l'être humain, l'atteinte la plus significative causée par cet organisme a pour siège le foetus en développement et les patients présentant un déficit immunitaire (SIDA, etc...). La toxoplasmose est responsable d'atteintes oculaires et cérébrales sévères et même mortelles chez les

15 nouveau-nés contaminés par voie transplacentaire, ainsi que chez les patients immunodéficients.

Chez l'homme, deux formes du parasite ont été décrites : le "tachyzoïte", qui est la forme multiplicative rencontrée au cours de la phase aiguë de la maladie, et le "bradyzoïte", forme résistante qui persiste enkystée dans les tissus nerveux et est vraisemblablement responsable de l'entretien d'une immunité durable à la réinfection.

20 Ce parasite est un pathogène important, non seulement chez l'homme mais également en médecine vétérinaire et il est très largement répandu géographiquement, à telle enseigne qu'on a pu établir que près de 500 millions de personnes dans le monde entier présenteraient une réaction sérologique positive à l'infection.

HUGHES, "CURRENT TOPICS IN MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY", Vol. 120 (1985), SPRINGER Ed., pages 105-139, passe en revue les différents tests de sérodiagnostic disponibles : test de coloration de SABIN et FELDMAN, standardisé par BEVERLY et BEATLE (1958) et perfectionné par FELDMAN et LAMB (1966), WALDELAND (1976) et BALFOUR et Al. (1982), qui requiert des parasites vivants, de grandes quantités de sérum humain normal et des spécialistes bien entraînés pour sa réalisation ; test de détection d'anticorps par immunofluorescence, qui présente les mêmes inconvénients que le test de coloration et qui a été mis au point par REMINGTON (1968) et perfectionné par KARIM et LUDLAM (1975) ; les tests d'hémagglutination, dont les résultats sont trop tardifs, notamment pour la détermination de la présence du parasite chez la femme enceinte ; test ELISA pour la détection d'anticorps de Toxoplasma, par isolement d'IgM in situ sur la microplaqué de test (WIELARRD et Al., 1983). Cependant, dans les test sérologiques utilisant des antigènes solubles, ces derniers sont obtenus par simple extraction (lyse à l'eau, congélation et décongélation ou éclatement par ultra-sons de tachyzoïtes de Toxoplasma). Ces techniques n'assurent la présence d'antigènes de membrane dans le système de test que s'ils sont aisément solubles dans l'eau ou le tampon ou si l'étape finale de centrifugation ne laisse subsister que peu de fragments de membrane en suspension dans la solution.

Les différents tests mis en œuvre reposent sur la formation d'anticorps pour la détection de différents antigènes, d'où l'importance de l'identification desdits antigènes dans le but d'améliorer la fiabilité et la sensibilité des tests. Trois antigènes de Toxoplasma avaient pu être identifiés par CHORDI et Al. (J. IMMUNOL., 93 (1964) pages 1034-1044), puis confirmés par HUGHES et BALFOUR (PARASITE IMMUNOL., 3, (1981), pages 235-248) et leur origine intracellulaire établie. L'analyse de polypeptides de Toxoplasma, provenant d'organismes traités par ultra-sons, par SDS - PAGE et par fixation de concanavaline marquée à l'¹²⁵I, a montré l'existence de 9 polypeptides intracellulaires d'origine parasitaire, de poids moléculaires compris entre 20 000 et 98 000, dont aucun n'est glycosylé. Il a été montré ultérieurement que 10 polypeptides obtenus par sonication, puis précipitation par de l'immun-sérum de souris, présentaient des propriétés antigéniques.

La technique de KOHLER et MILSTEIN d'hybridation avec des cellules lymphoïdes a permis de développer des anticorps monoclonaux pour sonder la structure antigénique de Toxoplasma. HUGHES [(1985) loc. cité] mentionné qu'à la date de sa Publication 32 anticorps monoclonaux avaient été décrits et réagissent contre des antigènes de membrane de Toxoplasma. Tous ont été définis du point de vue sérologique ; 4 présentent une réactivité à la fois contre les composants de la membrane et du cytoplasme et 28 sont positifs uniquement dans des tests de reconnaissance des antigènes de membrane. Les tests d'immunoprecipitation et de SDS - PAGE appliqués à ces anticorps monoclonaux ont montré que la majorité d'entre eux réagissent contre des antigènes de poids moléculaires 35KD, 27KD et 14KD. Les anticorps résultant des clones 3E6 et 2G11 précipitent tous deux les antigènes de P.M. 35KD et 14KD [HANDMAN et Al. J. IMMUNOL., (1980) pages 2578-2583], de même que les anticorps monoclonaux FMC 18, FMC 22, FMC 23 développés par JOHNSON et Al. [J. EXP. BIOL. MED. SCI. 59 (1981), pages 303-306], tous ces anticorps étant spécifiques aux membranes des tachyzoïtes, KASPER et Al. [J. IMMUNOL. (1982), 129, pages 1694-1699 et (1983) 130, pages 2407-2412] ont récemment décrit deux antigènes précipitables de poids moléculaires 22KD (P22) et 30KD (P30).

De plus, JOHNSON et Al. [J. PROTOZOOL (1983), 30, pages 351-356] ont montré que des anticorps monoclonaux qui réagissent contre le même antigène de membrane peuvent reconnaître différents épitopes et HUGHES suggère en relatant ces derniers travaux (Page 11, loc. cité) que des études similaires pourraient

être effectuées sur d'autres anticorps monoclonaux qui reconnaissent un antigène commun et pourraient permettre de définir la structure moléculaire des épitopes concernés.

Dans sa revue apparemment exhaustive (loc. cité), HUGHES souligne également l'importance de la détection des antigènes circulants dans les fluides corporels : alors que l'infection par Toxoplasma gondii conduit normalement à une réponse humorale rapide démontrable par des tests sérologiques tels que ceux énumérés plus haut, ceux-ci peuvent ne pas être suffisants pour le clinicien lorsqu'il faut diagnostiquer rapidement et avec précision la présence d'une infection aiguë à partir d'un échantillon unique de sérum. Ceci est particulièrement important dans le cas d'un patient immunodéficient qui représente un danger de dissémination ou en cas d'hypogammaglobulinémie sous-jacente. Si la détection d'une antigénémie permet de confirmer dans ces cas comme pendant la phase aiguë de l'infection, la présence d'une infection active, dans la toxoplasmose congénitale, la détection d'antigènes dans des fluides corporels tels que le liquide amniotique ou le liquide céphalorachidien, peut également fournir une indication au sujet de la gravité de l'infection par Toxoplasma et permettre, par conséquent, de prendre des décisions sur le plan de la thérapeutique et du pronostic à adopter.

Des études de double diffusion ont montré qu'un antigène circulant détecté dans du sérum de souris atteintes de toxoplasmose aiguë, présente des composants communs avec des extraits de Toxoplasma lysés par de l'eau, est une protéine thermolabile (56°C/30 minutes) et son poids moléculaire (obtenu après l'avoir isolé par chromatographie d'affinité) est supérieur à 100 000, de même que des antigènes circulants présents dans du sérum de rats infectés.

Les antigènes circulants peuvent être libérés de deux façons : soit par sécrétion active par le parasite, soit par immunolyse. Il a été montré que les antigènes circulants ne présentent pas d'identité immunologique avec de simples extraits aqueux ou des lavages péritonéaux, ce qui implique que l'antigénémie n'est pas simplement un résultat de para sites mourants ou de la libération d'antigènes de cellules infectées. Toutefois l'antigène présent dans les immunocomplexes circulants récemment décrits par SIEGEL et REMINGTON [CLIN. EXP. IMMUNOL. (1983) 52, pages 157-163] n'a pas encore été identifié.

Par ailleurs JOHNSON [PATHOLOGY (1985), 17, pages 9-19] souligne que la plupart des travaux sur le sujet ont utilisé la forme "tachyzoïte" de parasite comme source d'antigène, alors que la voie naturelle de transmission de la toxoplasmose est l'ingestion orale soit des sporozoïtes présents dans les oocystes (qui ne se trouvent que chez le chat), soit des bradyzoïtes dans les kystes des tissus. Il a été démontré qu'il existe un antigène commun aux 5 formes (schizonte, gamétozyte, sporozoïte, tachyzoïte, bradyzoïte) du cycle vital de Toxoplasma et qu'un antisérum marqué à la fluorescéine, produit contre le tachyzoïte, réagit spécifiquement avec les 4 autres formes. Or, d'autres Auteurs [LUNDE et JACOBS, J. PARASITOL. (1983) 69, 806-808] ont montré qu'il y a des différences antigéniques entre les tachyzoïtes et les bradyzoïtes : de l'antisérum anti-bradyzoïtes, marqué à la fluorescéine, ne réagit que contre les bradyzoïtes, alors que l'anti-sérum anti-tachyzoïtes réagit aussi bien contre les tachyzoïtes que contre les bradyzoïtes. De même, les essais effectués par KASPER et Al. [J. IMMUNOL. (1984), 132, pages 443-449] ont corroboré ce résultat, encore que les différences antigéniques qu'ils ont montrées entre les sporozoïtes et les tachyzoïtes puissent permettre d'envisager la possibilité du développement de tests de diagnostic aptes à différencier les deux voies d'infection par Toxoplasma.

Selon HUGHES (loc. cité), la vaccination contre la toxoplasmose ne pourra être envisagée avec les anticorps monoclonaux, avec plus de succès que les tentatives antérieures (vaccins utilisant des organismes tués ou des organismes atténués) que dans la mesure où il pourra être établi que les antigènes isolés par chromatographie d'affinité en utilisant les anticorps FMC19 et FMC22 isolés par JOHNSON et Al. (loc. cité), sont protecteurs et qu'ils sont aptes à induire une réponse humorale. En effet, les résultats rapportés jusqu'alors ne sont pas suffisamment probants à ce sujet, à ce jour : JOHNSON et Al. (1983, loc. cité) ont trouvé que les anticorps monoclonaux FMC19 et FMC22 peuvent induire une protection contre des souches virulentes et très virulentes de Toxoplasma, en réagissant contre les antigènes de PM 35KD et 14KD ; cependant, d'autres anticorps monoclonaux qui précipitent les mêmes antigènes, à l'analyse par SDS - PAGE, ne procurent pas le même degré de protection, en sorte que les Auteurs ont supposé qu'ils reconnaissaient des épitopes différents sur le même antigène. Les deux anticorps monoclonaux qui induisent une protection sont des isotypes IgG3 et IgG1 respectivement. Les deux anticorps monoclonaux qui n'induisent pas de protection significative sont respectivement des isotypes IgG1 (FMC23) et IgG2a (2G11). Si, en ce qui concerne FMC23, l'absence de protection serait effectivement à rapporter à la différence entre les épitopes reconnus par rapport à FMC 19 ou FMC 22, en ce qui concerne 2G11 elle pourrait également être due aux particularités différentes de la sous-classe IgG2a par rapport aux sous-classes IgG1 et IgG3.

KASPER et Al. [J. IMMUNOL. (1985) 134, pages 3426-3431] ont décrit des tentatives d'immunisation de souris par une protéine de membrane de tachyzoïtes de Toxoplasma gondii purifiée, la protéine P 30, et un anticorps monoclonal dirigé contre cet antigène ; ils ont observé chez les souris traitées une augmentation statistiquement significative de la mortalité par rapport à des souris témoins non-immunisées et, chez les souris vaccinées, un nombre accru de kystes tissulaires intercérébraux par rapport à un groupe témoin. Des résultats similaires ont été obtenus avec une immunisation passive par transfert, à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre l'antigène P 30. Comme les bradyzoïtes ne contiennent ni l'antigène P30, ni l'antigène P22, il n'est pas exclu, selon les Auteurs, que cet échec soit dû à la résistance des parasites aux anticorps anti-tachyzoïtes.

Les travaux les plus récents dans ce domaine ont fait l'objet d'Abstracts publiés dans la Revue

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

"MOLECULAR STRATEGIES OF PARASITIC INVASION" éditée par l' UCLA en Janvier 1986 :

- BOOTHROYD, BURG, NAGEL, OSSORIO, PERELMAN, KASPER, WARE, PRINCE, SHARMA et REMINGTON (Abstract C19) ont utilisé les techniques mettant en oeuvre l'ADN recombinant et les anticorps monoclonaux dans le but de mieux comprendre les propriétés biologiques et les propriétés inductrices de la toxoplasmose ; à cet effet, ils ont utilisé les anticorps monoclonaux et polyclonaux dirigés contre les principaux antigènes de surface du parasite, pour isoler et caractériser leurs gènes respectifs. Ils ont produit des séquences partielles ou complètes de nucléotides de certains de ces gènes et ils ont aussi cloné et partiellement séquencé les gènes d' α - et de β -tubulines qui ne sont présents chacun qu'en un seul exemplaire

5 dans Toxoplasma gondii. Ces derniers ont fait l'objet d'une caractérisation plus poussée rapportée dans l'Abstract C 59 par NAGEL et BOOTHROYD.

10 - BURG, PERELMAN et BOOTHROYD (Abstract C 85) décrivent l'élaboration d'une banque d'expression dans le phage λ Gt11 en utilisant l'ADN génomique de Toxoplasma gondii et l'isolement à partir de cette banque, à l'aide d'immun-sérum de souris infectées par Toxoplasma gondii, d'une séquence possédant un potentiel codant pour un déterminant antigénique majeur du parasite, qui est le gène TgB1. Cette séquence semble

15 spécifique à Toxoplasma gondii et le déterminant antigénique produit dans le clone TgB1 λ gt11 est reconnu par l'immun-sérum de souris, de rat et d'homme.

20 Ces Auteurs décrivent également le criblage d'une banque d'expression de l'ADNc du Toxoplasma (également cons truite à l'aide du phage λ gt11) pour isoler des séquences codant pour les antigènes présents sur la surface du parasite, à l'aide d'antisérum polyclonal dirigé contre les protéines antigéniques de surface P 30 et P 22 purifiées. En utilisant l' ADNc de l'antigène P 22 comme sonde dans un immunotransfert de Northern, ils ont détecté une seule espèce d'ARN comprenant environ 1600 nucléotides.

25 - PRINCE, REMINGTON et SHARMA (Abstract C 106) ont caractérisé un antigène de Toxoplasma gondii reconnu par un anticorps monoclonal (mab)F₃G₃ dont ils ont déterminé qu'il procure à des souris une immunité protectrice de longue durée (supérieure à 9 mois). Le clonage des gènes codant pour les antigènes de Toxoplasma gondii a été obtenu en élaborant une banque d' ADNc de tachyzoïtes dans le vecteur d'expression gt11, puis criblage de celle-ci à l'aide d'un anticorps polyclonal de souris dirigé contre l'antigène F₃G₃.

30 Des clones recombinants isolés par criblage à l'aide de la sonde anticorps monospécifique, contiennent un insert d' ADN de Toxoplasma gondii qui code pour 1/6e de la protéine intacte et l'antigène recombinant qui résulte de ces clones est également reconnu par (mab)F₃G₃.

35 Les travaux effectués dans le domaine de la Toxoplasmose ont largement démontré : - la nécessité d'identifier des antigènes du stade tachyzoïte et du stade bradyzoïte présentant des épitopes communs, pour permettre l'établissement d'une immunité concomitante ; - la nécessité de l'identification des antigènes excrétés-sécrétés par les tachyzoïtes et de l'évaluation de l'importance de leur rôle dans l'immunité protectrice - et la nécessité de la mise en évidence du rôle des anticorps de classe IgE dans l'immunité protectrice contre la toxoplasmose.

40 La présente invention a pour objet des antigènes de Toxoplasma gondii (TG) caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des antigènes d'excrétion-sécrétion (ES) des tachyzoïtes de TG.

Dans le cadre de leurs recherches dans le domaine des maladies parasitaires humaines et plus particulièrement de la toxoplasmose, les Inventeurs sont parvenus à identifier les mécanismes effecteurs et immunorégulateurs de ces affections et ils ont notamment pu établir l'importance des antigènes excrétés-sécrétés dans l'élaboration de la réponse immunoprotectrice, alors que les antigènes de membrane sont plus particulièrement impliqués dans l'induction d'isotypes aussi bien effecteurs que bloquants.

45 Ces découvertes ont conduit les Inventeurs à chercher à isoler lesdits antigènes excrétés-sécrétés, dans le but, notamment, de la mise au point d'un vaccin contre la toxoplasmose.

Conformément à l'invention, les antigènes ES isolés des tachyzoïtes de Toxoplasma gondii sont caractérisés en ce qu'ils constituent un groupe d'antigènes dont les 20 majeurs qui ont été détectés, présentent des poids moléculaires respectifs de 185KD, 170KD, 155KD, 105KD, 98KD, 84KD, 68KD, 57KD, 53KD, 45KD, 43KD, 39KD, 35KD, 34KD, 31KD, 30KD, 26KD, 25KD, 24KD et 20KD environ.

50 Selon une disposition avantageuse de l'invention, les antigènes de poids moléculaires 185KD, 170KD, 155KD, 105KD, 57KD, 53KD, 45KD, 43KD, 39KD, 35KD, 34KD, 31KD, 30KD, 26KD, 25KD et 24KD sont reconnus au cours de la phase chronique.

Selon une autre disposition avantageuse de l'invention, l'antigène de poids moléculaire 105KD est identifié comme un marqueur de la phase chronique.

55 Selon encore une autre disposition avantageuse de l'invention, l'antigène de poids moléculaire 84KD est identifié comme un marqueur transitoire de la phase chronique.

Selon une autre disposition avantageuse de l'invention, l'antigène de poids moléculaire 24KD est identifié comme un marqueur tardif de la phase chronique, également mar queur d'immunité protectrice.

60 Selon encore une autre disposition avantageuse de l'invention, l'antigène de poids moléculaire 98KD est identifié comme un marqueur de la phase aiguë.

Selon une autre disposition avantageuse de l'invention, l'antigène de poids moléculaire 68KD est identifié comme un marqueur de la phase aiguë, cependant moins spécifique que l'antigène 98KD.

65 Selon une disposition avantageuse de l'invention, les antigènes ES de TG sont isolés de surnageants recueillis après incubation d'une suspension de tachyzoïtes de Toxoplasma gondii pendant environ 3 heures dans un milieu RPMI 1640 contenant 10 % de sérum décomplémenté d'origine humaine ou animale et

centrifugation puis ultrafiltration des surnageants recueillis, éventuellement suivie d'une étape de concentration et d'une nouvelle étape de centrifugation, ainsi que d'un traitement de congélation à -70°C, lesquels antigènes ES sont capables d'induire une réponse humorale protectrice contre la toxoplasmose.

Egalement conformément à l'invention, les antigènes de Toxoplasma gondii sont caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des antigènes des bradyzoïtes de Toxoplasma gondii.

Selon une disposition particulièrement avantageuse de l'objet de l'invention, les antigènes de Toxoplasma gondii sont caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des antigènes communs aux tachyzoïtes et aux bradyzoïtes de Toxoplasma gondii.

Conformément à l'invention, ces derniers sont identifiés par immunoprécipitation de sérum de mammifères, notamment de sérum humain ou animal, reconnus comme séropositifs (soit de phase aiguë contenant des IgM spécifiques, soit de phase subaiguë contenant à la fois des IgM et des IgG, soit de phase chronique contenant des IgG), par des antigènes de tachyzoïtes et de bradyzoïtes et/ou le cas échéant par des produits de traduction de ces antigènes, conformes à la présente invention, de préférence préalablement radiomarqués, puis dissociation des immunoprécipités formés, suivie d'une électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE), d'une autoradiographie des gels et de leur révélation.

Selon une modalité avantageuse de cette disposition, un antigène de Toxoplasma gondii commun aux tachyzoïtes et aux bradyzoïtes, excrété-secrété par les tachyzoïtes, isolé de manière appropriée, se caractérise par son poids moléculaire d'environ 43KD, par le fait qu'il est de nature glycoprotéique et par le fait qu'il est reconnu par des sérum anti-ES, par des sérum de souris anti-bradyzoïtes et par des sérum humains prélevés chez des malades.

Selon une autre modalité de cette disposition, un antigène de Toxoplasma gondii commun aux tachyzoïtes et aux bradyzoïtes, excrété-secrété par les tachyzoïtes, isolé de manière appropriée, se caractérise par un poids moléculaire d'environ 25KD-24KD et par le fait que sa localisation dans les tachyzoïtes est confirmée par immunoprécipitation par les sérum anti-bradyzoïtes.

Conformément à l'invention, les antigènes de bradyzoïtes de Toxoplasma gondii sont isolés de kystes récupérés de broyats de tissus de mammifères, tels que souris notamment, infectés par la forme chronique de Toxoplasma gondii, lesquels kystes sont purifiés sur un gradient approprié, soniqués puis broyés à l'état congelé et centrifugés pour recueillir un surnageant contenant les antigènes cytoplasmiques (fraction S₁) et le culot dont on libère les antigènes membranaires (fraction S₂) à l'aide d'un détergent approprié.

La présente invention a également pour objet des produits de traduction d'ARNm de tachyzoïtes qui sont caractérisés en ce qu'ils portent les épitopes reconnus par les antigènes ES de Toxoplasma gondii.

Selon une disposition avantageuse de l'invention, ces produits de traduction sont obtenus par précipitation d'ARN à partir de lysats de tachyzoïtes centrifugés dont le culot est extrait par des agents d'extraction appropriés pour précipiter l'ARN, purification des ARN messagers par séparation des ARN poly A+ de l'ARN total par chromatographie, puis traduction in vitro des ARN dans du lysat de réticulocytes en présence d'un mélange d'amino-acides dépourvu de L-méthionine et comprenant la ³⁵S-méthionine, en milieu tamponné, et synthèse d'ADNc à partir de l'ARNm de tachyzoïtes précédemment obtenu, par action de la transcriptase réverse d'AMV, la banque d'ADNc ainsi formée étant ensuite criblée pour identifier les phages recombinants dont l'insertion d'ADNc dirige la synthèse d'une protéine ou fraction de protéine portant les épitopes reconnus par les anticorps anti-ES et y sélectionner les clones ES reconnus par des sérum humains, les clones retenus étant caractérisés par sélection d'anticorps.

La présente invention a également pour objet des sérum riches en anticorps IgE propres à conférer une protection significative contre la toxoplasmose et en particulier contre les tachyzoïtes, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus à partir d'animaux immunisés par des antigènes ES.

La présente invention a en outre pour objet des anticorps monoclonaux caractérisés en ce qu'ils sont produits par des cultures d'hybridomes résultant de la fusion de cellules d'animaux immunisés par les antigènes ES, avec des cellules tumorales.

La présente invention a, de plus, pour objet des vaccins propres à procurer une protection significative contre la toxoplasmose, caractérisés en ce qu'ils contiennent en tant que constituant actif des anticorps polyclonaux ou monoclonaux anti-ES.

La présente invention a également pour objet des compositions thérapeutiques pour le traitement de la toxoplasmose, caractérisées en ce qu'elles contiennent en tant que constituant actif, des antigènes ES, et plus particulièrement des antigènes ES présentant des épitopes et des déterminants communs aux tachyzoïtes et aux bradyzoïtes.

La présente invention a en outre pour objet des produits de diagnostic de la toxoplasmose, y compris de la toxoplasmose congénitale, caractérisés en ce qu'ils contiennent en tant que constituants actifs, des antigènes ES.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre.

L'invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de préparation d'antigènes de Toxoplasma gondii, et plus particulièrement d'antigènes ES, de caractérisation de ceux-ci et de préparation d'anticorps anti-ES.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

EXEMPLE 1 - Préparation d'antigènes d'excration-sécrétion des tachyzoïtes (antigènes ES)**a) Conditions d'excration :**

5 La viabilité des parasites est évaluée par un test préalable de survie à l'érythrosine B : 30 microlitres de la suspension de tachyzoïtes et 30 microlitres d'une solution d'érythrosine B à 4 milligrammes par millilitre en tampon PBS 0,01 M pH 7,2 sont mis en contact sur un bain de glace pendant 5 minutes exactement avant observation microscopique. On détermine alors le pourcentage de tachyzoïtes vivants, respectés par le colorant et apparaissant réfringents, et de tachyzoïtes morts, pénétrés par l'érythrosine et colorés en rose.

10 Ce test de survie a permis d'établir que les conditions de survie optimales correspondent à une excration active, sans libération d'antigènes cytoplasmiques par lyse des parasites.

15 Les antigènes ES sont obtenus en incubant pendant 3 heures les tachyzoïtes (à raison de $1,8 \times 10^8$ tachyzoïdes par tube de 1,5 millilitre de milieu d'excration) dans du milieu RPMI 1640 contenant 10 % de sérum décomplémenté d'origine humaine ou animale.

20 La comparaison de la cinétique d'excration en présence de sérums de diverses origines à montré que les meilleurs résultats sont obtenus par ordre décroissant avec des sérums humains, de veau foetal, de lapin, de rat et de souris. Les antigènes excrétés en présence de ces différents sérums sont qualitativement identiques.

25 A la fin des 3 heures d'incubation, une centrifugation à 2800 tours par minute pendant 10 minutes permet de séparer les surnageants contenant les antigènes ES. Ces surnageants sont ensuite filtrés sur membrane Millipore (0,22 µm) puis concentrés 10 fois par centrifugation à 5000 tours par minute pendant 40 minutes en tubes Centricon 10 (Amicon). Ces préparations d'antigènes ES sont conservées par congélation à -70°C après addition d'une solution d'inhibiteurs de protéases présentant la composition suivante :

- pour 100 ml de PBS 10 mM pH 7,2 =
- Fluorure de Phénylméthylsulfonyl (PMSF) (Sigma) : 100 µl d'une solution à 40 mM dans l'éthanol absolu
- N p Tosyl-L-lysine-chlorométhylcétone (TLCK), (Sigma) = 7,3 mg
- Acide Ethylène diamine tétraacétique, sel disodique (EDTA) (Prolabo) = 75 mg
- N Tosyl-L-Phénylalanine-chlorométhylcétone (TPCK) (Sigma) = 7 mg

b) Marquage métabolique par la méthionine ^{35}S :

30 Après filtration sur membrane Nuclepore (3µm) et lavages en milieu RPMI, les tachyzoïtes sont mis en suspension, à raison de $1,2 \cdot 10^8$ tachyzoïtes/ml dans du milieu RPMI 1640 sans méthionine ni cystine, contenant 10 % de sérum décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 30 minutes : ce sérum a été préalablement dialysé une nuit à +4°C contre une solution de NaCl 9 %/oo et filtré sur membrane Millipore (0,22 µm).

35 La suspension de tachyzoïtes est répartie sous un volume de 1,5 millilitre dans des tubes à hémolyse placés à 37°C et soumis pendant 30 minutes à une agitation douce.

40 On ajoute ensuite au milieu de cette culture la méthionine marquée (225 microcuries par tube) et on réincube à 37°C sous agitation douce. Au bout d'une heure, on ajoute dans chaque tube 15 microlitres de méthionine et 15 microlitres de cystine froide du Kit RPMI (Difco) avant de replacer les tubes à 37°C sous agitation pendant 1 h.30. Après centrifugation à 2800 tours par minute, pendant 10 minutes, on sépare pour les traiter différemment les surnageants contenant les antigènes ES, des culots constitués des parasites entiers.

45 Après filtration sur membrane Millipore (0,22µm), puis passage sur colonnes de Sephadex G25 M (PD 10 de Pharmacia) pour éliminer la méthionine libre, les surnageants sont concentrés 10 fois par centrifugation à 5000 tours par minutes, pendant 40 minutes, en tubes Centricon 10 (Amicon). Les antigènes ES sont conservés par congélation à -70°C après addition d'inhibiteurs de protéases tels que décrits plus haut.

c) Marquage des antigènes contenus dans le culot, par la méthionine ^{35}S :

50 Les culots obtenus ci-dessus sont lavés deux fois en PBS 0,01 M pH 7,2 et repris par de l'eau distillée avant d'être soumis à 6 cycles de congélation (en azote liquide) et décongélation (en bain-marie à 37°C) successifs.

55 Une nouvelle centrifugation (2800 tours par minute pendant 10 minutes) permet de séparer les surnageants (contenant les antigènes cytoplasmiques), des culots, à partir desquels seront extraits les antigènes membranaires.

L'extraction et la solubilisation des anti gènes membranaires est obtenue par traitement au Nonidet P 40 ou au CHAPS(/3 cholamido-propyl diméthylammonio-/propane-sulfonate) (FLUKA), suivi d'une centrifugation à 5000 tours/mn pendant 30 minutes : les antigènes membranaires solubilisés sont contenus dans le surnageant.

60 Les antigènes cytoplasmiques et membranaires sont conservés par congélation à -70°C en présence d'une solution d'inhibiteurs de protéases.

d) Marquage des antigènes membranaires des tachyzoïtes par ^{125}I (Iodogen) :

65 La méthode de marquage utilisée est une modification de la méthode utilisant l'IODO-GEN décrite par

HOWARD et Al. [HOWARD, R.J., KAVSHAL, D.C., CARTER, R., J. PROTOZOOL., (1982) 22, 114]. Les tachyzoïtes obtenus par lavages péritonéaux de souris infectées par la souche R.H. de T. gondii sont lavés deux fois par du PBS 0,01 M pH 7,2 après filtration sur filtres Nuclépore 3 μ m.

On dissout 1 milligramme d'IDEO-GEN (PIERCE Chemical Co., Rockford, IL) dans 10 millilitres de chloroforme et on transfère 625 microlitres de cette solution dans un tube en verre. On évapore alors le solvant sous courant d'azote et on ajoute 10⁸ tachyzoïtes. Après 10 minutes de contact à 4°C avec 500 μ Ci d'¹²⁵I, on transfère le mélange dans un autre tube contenant du PBS 0,1 M, pH 7,2, NaI 10 mM pour arrêter la réaction. On lave ensuite trois fois les tachyzoïtes en PBS 0,1 M, pH 7,2. Les antigènes membranaires sont ensuite extraits par le Nonidet P40 ou le CHAPS

EXEMPLE 2 - Préparation d'antigènes des bradyzoïtes :

a) Production de bradyzoïtes ; extraction des antigènes :

Les bradyzoïtes, stade enkysté du toxoplasme, sont produits en infectant par voie intraperitoneale des souris SWISS avec environ 30 kystes de la souche "chronique" 76 K de Toxoplasma gondii. Après 4 à 6 semaines, les souris infectées présentent de 1000 à 2000 kystes intracérébraux.

Les kystes, récupérés à partir de broyats de cerveaux de souris infectées, ont été tout d'abord purifiés sur gradient de gomme arabique, selon la technique de Nakabayashi et Motomura (1968). La technique d'extraction des antigènes des bradyzoïtes (présents dans les kystes) choisie est la suivante : les kystes sont soumis aux ultra-sons (quatre fois 1 minute), puis broyés à l'état congelé par 17 passages à la X-Presse. Après centrifugation à 32000 g pendant 2 heures à +4°C, le surnageant contenant les antigènes cytoplasmiques (fraction S₁) est recueilli et le culot est traité par le détergent CHAPS qui libère les antigènes membranaires (fraction S₂). Les différentes étapes sont effectuées en présence d'une solution d'inhibiteurs de protéases.

b) Marquage des antigènes des bradyzoïtes par ¹²⁵I :

Le marquage est réalisé suivant la technique de HUNTER & GREENWOOD (chloramine T) [(1962) Nature, London, 194, 495-496].

Les fractions S₁ et S₂ (contenant de 250 à 500 μ g de protéines) sont placées dans un faible volume de tampon phosphate de sodium 0,5 M final, pH 7,4 (300 à 400 μ l).

La réaction de marquage est identique dans les deux cas :

- addition de 500 μ Ci Na¹²⁵I (Amersham) + 100 μ l d'une solution à 2 mg/ml de chloramine T (Merck)
- incubation 1 min. 30 à température ambiante sous agitation douce
- addition de 100 μ l d'une solution à 4 mg/ml de métabisulfite de sodium (Prolabo)
- dialyse sur une colonne PD10 (Pharmacia) contre du PBS pour éliminer l'iode libre.

EXEMPLE 3 - Isolement par immunoprecipitation et électrophorèse SDS-PAGE, des antigènes ES présentant des épitopes communs aux tachyzoïtes et aux bradyzoïtes :

a) Immunisation par les antigènes d'excrétion-secrétion des tachyzoïtes :

- Rats Fisher

Immunisation par 4 injections sous-cutanées réalisées avec des intervalles de 10 à 14 jours.

Produit injecté : antigènes ES obtenus à l'Exemple 1 correspondant à l'excrétion de 10⁸ tachyzoïtes sous un volume de 300 μ l, additionnés de 300 μ l d'adjuvant incomplet de Freund.

- Souris Balb/C

Immunisation par 4 injections sous-cutanées réalisées à 10 jours d'intervalle.

Produit injecté : antigènes ES obtenus à l'Exemple 1 correspondant à l'excrétion de 0,5 x 10⁸ tachyzoïtes sous un volume de 100 μ l, additionnés de 100 μ l d'adjuvant incomplet de Freund.

- Lapins

Les lapins ont été immunisés selon la technique de Vaitukaitis et Al.[J. Clin. Endocr.(1971), 33, 988-991]: 40 injections intradermiques sont réalisées avec 1 ml d'antigènes ES (correspondant à l'excrétion de 8.10⁸ tachyzoïtes additionnés d'1 ml d'adjuvant complet de Freund) + 1 injection intra-musculaire de 1 ml de vaccin anti-coquelucheux (Vaxicoq, Institut Mérieux). Des rappels avec 1/10e de la dose de départ sont réalisés toutes les trois semaines à partir de 1 mois par voie intra-musculaire.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

b) Immunisation par les antigènes des bradyzoïtes :

- Rats Fischer

- 5 4 injections sous-cutanées avec des intervalles de 10 à 14 jours.
- Antigènes solubles (S1)
- 10 Par injection : environ 60 µg d'antigènes solubles (S1) obtenus à l'Exemple 2 dans 300 µl de PBS 10mM pH 7,2 + 300 µl d'adjuvant incomplet de Freund.
- Antigènes membranaires (S2)
- 15 Par injection : 130 µg d'antigènes membranaires (obtenus à l'Exemple 2) dans 300 µl d'adjuvant incomplet de Freund.
- Souris Balb/C
- 20 4 injections sous-cutanées à 10 jours d'intervalle.
- Antigènes solubles (S1)
- 25 Par injection : 15 µg d'antigènes (obtenus à l'Exemple 2) dans 75 µl de PBS 10 mM pH 7,2 + 75 µl d'adjuvant incomplet de Freund.
- Antigènes membranaires (S2)
- 30 Par injection : 60 µg d'antigènes membranaires (obtenus à l'Exemple 2) dans 75 µl de PBS 10 mM pH 7,2 + 75 µl d'adjuvant incomplet de Freund.

c) Immunisation par les antigènes de cerveau de souris Swiss (productrices des kystes) :

35 Un cerveau de souris Swiss a été broyé, puis soumis de la même façon que les bradyzoïtes à 17 passages à la X-Press. L'immunisation de rats Fisher et de souris Balb/c par l'extrait soluble a été réalisée de la même façon qu'avec les antigènes S1 des bradyzoïtes.

d) Protocole d'infection de rats et de souris :

- 40 Infection de rats Fischer
- Infection par voie intrapéritonéale par 10^5 ou 10^7 tachyzoïtes de la souche RH dans 500 µl de PBS 10 mM pH 7,2.
- 45 Infection de rats Nu/Nu [cf SANTORO et al., (C.R. ACAD. SCI. (1987), 304, 297-300)]
- Infection de souris Balb/C
- 50 Infection par voie intrapéritonéale à raison de 5 à 30 kystes de la souche "chronique" 76 K dans 250 µl de PBS 10 mM, pH 7,2.

e) Sérum humains

55 741 sérum, recueillis au Laboratoire Saint- Camille à Lille, aux fins de diagnostic, ont été caractérisés par les tests sérologiques classiques : agglutination directe avant et après traitement par le mercapto-2-éthanol (technique de COUZINEAU) et immunofluorescence indirecte à l'aide d'un sérum de chèvre anti-immunoglobulines humaines G-A-M (IPP, technique de WELLER et COONS) et d'un sérum de chèvre anti IgM humaines (IPP, technique de REMINGTON).

60 Les Inventeurs ont ainsi répertorié 139 sérum "aigus", caractérisés par la présence d'IgM spécifiques reconnues par au moins deux méthodes sur les trois utilisées, 462 sérum "chroniques", dépourvus d'IgM spécifiques, et 140 sérum négatifs par toutes les techniques.

f) Immunoprécipitation des antigènes

- 65 f).1 - Les échantillons sériques, préalablement stérilisés par filtration sur membrane Millipore (0,22

micromètre), sont aliquotés par 10 microlitres en tubes siliconés (Eppendorf). On ajoute dans ces tubes 500 microlitres de tampon d'absorption (Tris 10 mM, EDTA 2 mM, NaCl 0,15 M, Nonidet P40 0,5 %, contenant 100 unités Kallikréine d'aprotinine par millilitre et ajusté à pH 7,4), puis la dose adéquate d'antigène marqué calculée en fonction du nombre de cpm dans la préparation initiale (40 000 cpm pour les ES marqués à la méthionine ^{35}S , 250 000 cpm pour les antigènes cytoplasmiques ou membranaires marqués à la méthionine ^{35}S , 400 000 cpm pour les antigènes des tachyzoïtes et des bradyzoïtes marqués à ^{125}I et 60 000 cpm pour les produits de traduction marqués à la méthionine ^{35}S). On laisse ensuite en agitation à température ambiante pendant trois heures.

f.2 - On prépare d'autre part une suspension de protéine A-Sépharose (Pharmacia) : on laisse gonfler une heure la protéine A-Sépharose dans le tampon d'absorption, à raison de 10 milligrammes de produit par échantillon à analyser. On répartir la suspension dans une nouvelle série de tubes siliconés qui sont séparés en deux groupes : le premier ne subit pas de manipulation dans l'immédiat et correspond aux échantillons pour lesquels la protéine A ne doit pas être prétraitée, tandis que le second correspond aux échantillons dans lesquels on veut capter, outre les anticorps de classe IgG qui se fixent d'eux-mêmes sur la protéine A, les anticorps de classe IgM dont la capture nécessite un artifice. Les tubes de ce second groupe sont donc centrifugés (1000 tours pendant 1 minute) et le surnageant éliminé. On ajoute au culot 200 microlitres de tampon d'adsorption et 50 microgrammes d'un anticorps de classe IgG et de spécificité anti-IgM. La fixation de cet anticorps est assurée par un temps de contact d'une heure sous agitation à température ambiante. Les billes de protéine A-Sépharose sont ensuite lavées deux fois dans le tampon d'adsorption.

Juste avant utilisation, les tubes des deux groupes sont centrifugés et le surnageant éliminé. On transfère dans ces tubes les immunoprécipités et on laisse en contact pendant une nuit à 4°C sous agitation douce.

Un cycle de 8 lavages par 1 millilitre de tampon d'adsorption est alors effectué. On vérifie la qualité des lavages en mesurant la radioactivité du 8ème surnageant ; de nouveaux lavages sont effectués si celle-ci est trop élevée. On ajoute alors à tous les culots 60 microlitres d'un tampon TRIS 125 mM, SDS 3 %, saccharose 20 %, bleu de bromophénol 0,1 % et β -mercaptoéthanol 20 %.

Après agitation, les tubes sont soumis à deux ébullitions successives de 1 min. 30, séparées par un nouveau temps d'agitation énergique (Vortex).

On centrifuge ensuite tous les tubes à 3000 tours par minute pendant 15 minutes et on transfère les surnageants contenant les immunoprécipités dissociés, dans une nouvelle série de tubes. On mesure sur 5 microlitres la radioactivité de chacun de surnageants, ce qui donne une idée approximative de la quantité piégée par les anticorps sériques. L'ensemble des échantillons est alors soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide.

f) Electrophorèse (SDS-PAGE) des immunoprécipités et autoradiographie.

Les électrophorèses en gels de polyacrylamide (SDS-PAGE) ont été réalisés selon le protocole décrit par LAEMMLI [(1970) Nature (London) 256, 495-497] dans un appareil à électrophorèse vertical BioRad.

Les échantillons traités sont séparés dans un gel homogène de polyacrylamide 10 % (dimensions : 14 x 16 cm). L'électrophorèse s'effectue sous un courant de 7mA durant 16 à 18 heures dans un tampon TRIS-glycine pH 8,3 contenant 1 % de SDS.

Après fixation des protéines par un mélange de méthanol et d'acide acétique, le gel est déshydraté sur papier Whatman (sécheur sous vide, BioRad). Si les antigènes recherchés sont marqués à la méthionine ^{35}S , le gel est imprégné pendant 20 minutes d'une émulsion photographique (Amplify AMERSHAM).

L'autoradiographie des gels se fait contre un film Kodak X-Omat RP et les films sont révélés après une exposition de 3 (anticorps marqués à ^{125}I) à 6 (anticorps marqués à la méthionine ^{35}S) jours à - 70°C.

g) Calcul des masses moléculaires des antigènes.

Les gels sont étalonnés grâce à un mélange de protéines précolorées de masse moléculaire connue (commercialisé par BRL, USA). On mesure la distance parcourue dans le gel par ces protéines au cours de l'électrophorèse. Les valeurs obtenues permettent d'établir la droite d'étalonnage $d = f(\log MM)$ et donc de déterminer la masse moléculaire des protéines présentes dans les échantillons analysés.

Les masses moléculaires des antigènes mentionnés dans le tableau qui va suivre représentent une moyenne établie à partir d'une trentaine de gels.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

TABLEAU I

ANTIGÈNES ES RECONNUS AU COURS DE LA TOXOPLASMOSE HUMAINE

Massé moléculaire	Spécificité
185 000	
170 000	Reconnus au cours de la phase chronique
<u>155 000</u>	
105 000	→ marqueur de la phase chronique "doublet" caracté-
98 000	→ marqueur de la phase AIGUE* risant la phase
	chronique
84 000	→ marqueur transitoire de la phase chronique
	marqueur de la phase aiguë,
<u>68 000</u>	de spécificité moindre que la 95 kD
	car faiblement reconnue par les sérumns négatifs
<u>57 000</u>	
<u>53 000</u>	
<u>45 000</u>	
<u>43 000</u>	
<u>39 000</u>	
<u>35 000</u>	Reconnus au cours de la phase chronique
<u>34 000</u>	
<u>31 000</u>	
<u>30 000</u>	
<u>26 000</u>	
<u>25 000</u>	
	marqueur tardif de la phase chronique ;
<u>24 000</u>	→ marqueur d'immunité protectrice
20 100	

* La 98 kD, présente tout au long de l'évolution de la maladie, est le premier antigène étroitement spécifique à être reconnu.

EXEMPLE 4 - Mise en évidence de la reconnaissance des Antigènes ES par des sérum s d'animaux.

Des antigènes ES marqués à la ^{35}S -méthionine (comme décrit à l'Exemple 1.b) immunoprécipités par différents sérum s d'animaux sont reconnus par ceux-ci comme indiqué dans le Tableau 2 ci-après.

5

Dans ce Tableau, les chiffres soulignés correspondent à des bandes majeures.

Les chiffres qui figurent dans ledit Tableau se rapportent aux masses moléculaires, en daltons, des antigènes ES reconnus.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

0301 961

Tableau II
BILAN DES ESA ($S^{35}\text{Met}$) RECONNUS PAR DES SERUMS

HUMAIN Chronique	SOURIS Chronique	SOURIS anti-ES	RAT INFECTÉ	RAT Anti-ES	RAT NUDE INFECTÉ
185 000			185 000		185 000
170 000	170 000		170 000	170 000	
<u>155 000</u>	155 000	<u>155 000</u>			
<u>98-105000</u>	<u>98-105000</u>	/	<u>98-105000</u>	<u>98-105000</u>	<u>98-105000</u>
(doublet)					
84 000	84 000	84 000	84 000	84 000	
<u>68 000</u>	<u>68 000</u>	<u>68 000</u>	68 000	68 000	68 000
				(faible)	
		65 000			
	62 000	62 000			
<u>57 000</u>	<u>57 000</u>		56 000	55 000	<u>55 000</u>
53 000		53 000			
<u>45 000</u>			45 000	45 000	
43 000		43 000	42 000	42 000	42 000
<u>39 000</u>				39 000	39 000
<u>35 000</u>	<u>35 000</u>	<u>35 000</u>	<u>35 000</u>	<u>35 000</u>	
34 000	<u>34 000</u>		34 000	34 000	<u>34 000</u>
31 000		31 000	31 000	31 000	31 000
				(faible)	
30 000					
<u>26 000</u>					
<u>25 000</u>	<u>25 000</u>	<u>25 000</u>	<u>25 000</u>	<u>25 000</u>	<u>25 000</u>
				(faible)	
<u>24 000</u>			24 000	24 000	24 000
20 100					

Antigènes membranaires majeurs des tachyzoïtes (^{125}I) reconnus par des sérum de rats et de souris immunisés par les antigènes ES

{ 43 000
 30 000

EXEMPLE 5 - Induction d'anticorps de classe IgE et leur rôle dans la toxoplasmose expérimentale du rat.

Chez le rat Fischer normal, comme chez la plupart des hôtes mammifères non-immunocompromis, l'infection par Toxoplasma gondii induit une immunité permanente. 5

Les mécanismes de la mémoire immunitaire sont connus pour être T-dépendants et nécessitent pour être entretenus la persistance de formes enkystées (bradyzoïtes) cérébrales.

Cependant, l'ensemble des mécanismes responsables de l'induction de cette immunité permanente sont mal connus.

Chez le rat Fischer Nu/Nu, qui représente un modèle de terrain immunocompromis, 10^5 tachyzoïtes de la souche RH de Toxoplasma gondii injectés I.P. sont suffisants pour tuer 100 % des animaux en 12 à 15 jours. 10

Des rats Fischer de 10-12 semaines ont été infectés par 10^7 tachyzoïtes de la souche RH de Toxoplasma gondii. De façon à mieux cerner le rôle des antigènes excrétés/sécrétés (ES), les animaux ont été inoculés soit par des tachyzoïtes vivants, soit par des tachyzoïtes irradiés (10 000 rads délivrés en 10 mn), soit par des antigènes ES préparés comme décrit précédemment.

L'augmentation du taux d'IgE spécifiques dans le sérum (mesuré par radioallergosorbent test ou RAST) et à la surface de certaines cellules sanguines (analysé par cytométrie de flux) a été suivie à intervalles réguliers.

De plus, le pouvoir protecteur de ces IgE spécifiques a été étudié par transfert chez les rats immunodéprimés Nu/Nu avant infection par 10^5 Toxoplasma gondii.

La figure 1 annexée montre la cinétique d'apparition des IgE sériques chez les rats Fischer normaux après différents traitements. 20

Les tachyzoïtes vivants induisent une réponse IgE spécifique. Cette réponse est extrêmement précoce et peut être détectée dès le 7ème jour après l'infection. La réponse maximum est observée au 21ème jour. L'injection d'antigènes ES à des rats normaux entraîne également une réponse IgE significative.

On peut noter que les antigènes ES induisent le même type de réponse mais moins intense. Néanmoins, après injection de rappel un mois après la première injection, l'augmentation des IgE spécifiques est beaucoup plus importante. On peut noter que l'utilisation d'adjuvants de la réponse IgE (*Bordetella pertussis*) avec les ES induit une augmentation significative des IgE au cours de la réponse primaire alors que l'injection de l'adjuvant seul n'entraîne pas de réponse spécifique. 25

La figure 2 annexée montre le résultat des transferts des différents types de sérums chez les rats Fischer Nu/Nu. Tous les sérums utilisés ont été prélevés pendant la réponse primaire au 2e jour. 30

Lorsque les animaux reçoivent 2 ml de sérums riches en IgE spécifiques provenant de rats normaux infectés par des tachyzoïtes vivants ou immunisés par des antigènes ES, on peut noter que l'augmentation du délai de survie est significative par rapport aux animaux qui ont reçu des sérums provenant de rats immunisés par des tachyzoïtes irradiés ou ayant reçu du sérum physiologique. 35

Cette augmentation de survie est effectivement due aux IgE car leur déplétion par immunoabsorption ramène la durée de survie à des valeurs proches de celles des contrôles.

La figure 3 annexée montre que des plaquettes provenant d'animaux infectés par des tachyzoïtes vivants ou immunisés par les ES confèrent aux rats Nu/Nu le même type de protection que des sérums des animaux correspondants. On peut également noter que les plaquettes provenant d'animaux immunisés par des tachyzoïtes irradiés ne protègent pas significativement les rats Nu/Nu. 40

La figure 4 annexée montre que la cinétique d'apparition des IgE à la surface des plaquettes est comparable à celle des IgE sériques. Les taux d'IgE à la surface des plaquettes varient suivant le type d'antigène utilisé de la même façon que les IgE sériques. Le délai de survie est dose-dépendant et une dose de 5×10^7 cellules est suffisante pour entraîner une protection significative. 45

La protection conférée par les plaquettes apparaît être liée à des phénomènes de type antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC). En effet (cf. figure 5 annexée), on peut observer que des plaquettes provenant d'animaux normaux infectés par des tachyzoïtes vivants ou immunisés par des ES, mais non par des tachyzoïtes tués, sont capables de détruire des tachyzoïtes *in vitro*. Les mécanismes de cette destruction ne sont pas encore élucidés. 50

EXEMPLE 6 - Réponse humorale contre les antigènes ES au cours des phases aiguë, subaiguë et chronique de la toxoplasmose humaine.

Technique utilisée : radioimmunoprecipitation et analyse des immunoprecipités en SDS-PAGE (gel de polyacrylamide 10 %). Antigènes : antigènes ES, cytoplasmiques et membranaires des tachyzoïtes marqués par la méthionine ^{35}S . 55

Sérums utilisés : sérums humains prélevés au cours des différentes périodes de la maladie : aiguë, subaiguë, chronique. Les résultats obtenus sont représentés à la figure 6 annexée.

- Les antigènes ES marqués ont été immunoprecipités par des sérums humains prélevés : 60
 - . en phase aiguë (piste 1)
 - . en phase subaiguë (piste 2)
 - . en phase chronique (pistes 3 et 4)
- et par des sérums négatifs (pistes 7 et 8).
- Des antigènes cytoplasmiques (extrait soluble de tachyzoïtes lysés par l'eau) et membranaires (extraits par le NP40) ont à titre comparatif été immunoprecipités par des sérums chroniques : 65

- . piste 5 : antigènes cytoplasmiques
- . piste 6 : antigènes membranaires.
- Les premiers antigènes qui sont reconnus sont les antigènes 68 et 98 KD, présents en phases aiguë et subaiguë (partie A)
- 5 - En période chronique (partie B), les sérum de patients reconnaissent les antigènes de masse approximative 105, 84, 57, 45, 39, 35, 25 et 24 KD.
La bande 105 KD forme avec la bande 98 KD un "doublet" spécifique de la phase chronique.

EXEMPLE 7 - Mise en évidence (après marquage par ^{125}I) d'un antigène 43 KD commun aux tachyzoïtes et aux bradyzoïtes, excrété-sécrété par les tachyzoïtes.

- Antigènes immunoprécipités :
- extrait membranaire de tachyzoïtes marqué par ^{125}I (Iodo-Gen)
 - 15 - antigènes solubles de bradyzoïtes (S1) marqués par ^{125}I (choramine T)
 - antigènes membranaires de bradyzoïtes (S2) extraits par le CHAPS, puis marqués par ^{125}I (chloramine T).

- Sérum utilisés :
- sérum de lapin immunisé par les antigènes ES
 - 20 - sérum de souris Balb/C immunisée par les antigènes membranaires (S2) des bradyzoïtes
 - sérum de souris Balb/C immunisée par des antigènes de cellules de cerveau de souris Swiss (les bradyzoïtes, provenant de souris Swiss, sont contaminés par des cellules de cerveau).
- Les résultats obtenus sont représentés à la figure 7 annexée :

- 25 Pistes 1 et 2 : Immunoprecipitation par un sérum de lapin anti-ES :
- d'antigènes membranaires de tachyzoïtes (piste 1)
 - d'antigènes membranaires (S2) de bradyzoïtes (piste 2)

- 30 Pistes 3 à 5 : Immunoprecipitation par un sérum de souris Balb/C anti-bradyzoïtes (fraction S2)
- d'un extrait membranaire de tachyzoïtes (piste 3)
 - d'un extrait soluble (fraction S1) de bradyzoïtes (piste 4)
 - d'un extrait membranaire (fraction S2) de bradyzoïtes (piste 5)

- 35 Pistes 6 à 8 : Immunoprecipitation par un sérum de souris Balb/C anti-cerveau
- d'un extrait soluble (S1) de bradyzoïtes (piste 6)
 - d'un extrait membranaire (S2) de bradyzoïtes (piste 7)
 - d'un extrait membranaire de tachyzoïtes (piste 8).

L'antigène 43 KD des tachyzoïtes et des bradyzoïtes reconnu par les sérum anti-ES et anti-bradyzoïtes l'est également par les sérum humains.

40 L'antigène d'environ 55 KD, reconnu par les sérum de souris anti-cerveau ne semble pas spécifique des bradyzoïtes.

EXEMPLE 8 - Mise en évidence (après marquage par la Met ^{35}S) d'un antigène d'environ 25 KD commun aux tachyzoïtes et aux bradyzoïtes, excrété-sécrété par les tachyzoïtes.

- 45
- Antigènes immunoprécipités (marqués par la méthionine ^{35}S)
 - Antigènes ES
 - Antigènes cytoplasmiques des tachyzoïtes (fraction H₂O)
 - 50 - Antigènes totaux des tachyzoïtes (traitement par le CHAPS des parasites entiers).

- Sérum utilisés
- sérum de souris Balb/C immunisées par les antigènes solubles (S1) ou membranaires (S2) des bradyzoïtes
 - sérum de souris Balb/C immunisées par un extrait de cellules de cerveau de souris Swiss
 - 55 - sérum de rats Fischer immunisés par les antigènes solubles (S1) ou membranaires (S2) des bradyzoïtes.
- Les résultats obtenus sont représentés à la figure 8 annexée.

- Pistes 1 à 3 : Immunoprecipitation par un sérum de souris Balb/c anti-bradyzoïtes (fraction S2)
- d'antigènes ES (piste 1)
- 60 - d'antigènes cytoplasmiques (fraction H₂O) des tachyzoïtes (piste 2)
- d'antigènes totaux (fraction CHAPS) des tachyzoïtes (piste 3).
- Pistes 4 à 6 : Immunoprecipitation par un sérum de souris Balb/C anti-bradyzoïtes (fraction S1)
- d'antigènes ES (piste 4)
- 65 - d'antigènes cytoplasmiques des tachyzoïtes (piste 5)

- d'antigènes totaux des tachyzoïtes (piste 6).
- Pistes 7 à 9 : Immunoprecipitation par un sérum de souris Balb/c anti-cellules de cerveau de souris Swiss
- d'antigènes ES (piste 7)
- d'antigènes cytoplasmiques des tachyzoïtes (piste 8)
- d'antigènes totaux des tachyzoïtes (piste 9). 5
- Pistes 10 à 12 : Immunoprecipitation par un sérum de rat Fischer anti-bradyzoïtes (fraction S2)
- d'antigènes totaux de tachyzoïtes (piste 10)
- d'antigènes cytoplasmiques de tachyzoïtes (piste 11) 10
- d'antigènes ES (piste 12).

EXAMPLE 9 - Mise en évidence de la nature glycoprotéique de l'antigène 43 KD.

Les antigènes de surface des tachyzoïtes marqués par ^{125}I (Iodo-Gen) ont été absorbés sur ConA-Sepharose ou sur WGA-Ultrogel en procédant comme suit : 15

La fixation sur lectines a été réalisée suivant le protocole décrit par COLMAN et Al. [(1981) EUR. J. BIOCHEM., 113, 339-348]

Tampon de couplage	20
150 mM NaCl	
0,7 mM MgCl ₂	
1 mM dithiothreitol	
0,7 mM MnCl ₂	
0,7 mM CaCl ₂	25
0,05 % sodium dodécyl sulfate	
20 mM Tris/HCl, pH 7,5	
Lectines : Concanavaline A : ConA-Sepharose (Pharmacia)	
Wheat germ agglutinin = WGA-Ultrogel (IBF)	
Antigènes :	30
1) Extrait membranaire (NP40) de tachyzoïtes marqués par ^{125}I (Iodogen)	
2) extrait H ₂ O de tachyzoïtes marqués par la méthionine ^{35}S	
3) extrait membranaire (CHAPS) de tachyzoïtes marqués par la méthionine ^{35}S . 35	

Technique utilisée.

Les réactions sont effectuées dans des tubes Eppendorf.

- Addition à 150 µl d'extrait 1) ou à 200 µl des extraits 2) et 3) de : 1 ml de tampon de couplage
- 250 µl de gel (ConA-Sepharose ou WGA-Ultrogel) pré équilibré dans le tampon de fixation. 40
- Après 15 mn de contact à température ambiante avec des agitations fréquentes, les tubes sont centrifugés. Le surnageant contient les antigènes non retenus. Le culot est ensuite lavé 3 fois dans le tampon de couplage, puis extrait par 3 x 200 µl de tampon de couplage contenant soit 0,4 M de O-Méthyl-α-D-mannopyranoside (IBF), dans le cas de la fixation sur Concanavaline A, soit 0,2 M de N-acétyl-glucosamine (Sigma) dans le cas de la WGA. Ces trois extractions successives constituent les éluats 1, 2 et 3.

La radioactivité est comptée dans les divers échantillons, puis les antigènes non traités, les fractions non retenues et les éluats (1+2) sont immunoprecipités par différents sérum.

Les antigènes de départ ainsi que les fractions retenues sur les deux lectines (éluats) ont été immunoprecipités par un sérum de lapin sain et un sérum de lapin anti-ES.

- La figure 9 montre :
- pistes 1, 3 et 5 : Immunoprecipitation par un sérum de lapin anti-ES. 50
 - pistes 2, 4 et 6 : Immunoprecipitation par un sérum de lapin sain.
 - pistes 1 et 2 : antigènes membranaires de tachyzoïtes, avant traitement.
 - pistes 3 et 4 : éluat ConA-Sépharose (antigènes fixés).
 - piste 5 et 6 : éluat WGA-Ultrogel. 55

Les pistes 3 et 5 montrent que l'antigène 43 KD se fixe sur la concavaline A et (faiblement) sur la WGA (agglutinine de germe de blé), démontrant ainsi sa nature glycoprotéique.

EXAMPLE 10 - Préparation des produits de traduction des ARNs messagers de tachyzoïtes.

60

a) Extraction de l'ARN total :

On utilise la méthode de AUFFRAY et ROUGEON [(1980) Eur. J. Biochem, 107, 303]. Les tachyzoïtes sont lysés par l'addition (10 fois le volume du culot parasitaire) d'une solution de LiCl 3M, Héparine 200 µg/ml ; 65

acétate de Na 10 mM, pH 5 ; SDS 0,1 %.

Après homogénéisation au Potter et conservation à + 4°C toute la nuit pour précipiter les ARNs, le lysat est centrifugé à 16 300 g pendant 40 minutes à + 4°C. Le culot est lavé deux fois par resuspension dans une solution de LiCl 4M, Urée 8M, puis de nouveau centrifugé à 16 300 g pendant 40 minutes à + 4°C. Le culot est ensuite dissous dans de l'H₂O RNAse-free. Cette solution est amenée à 0,1 M en acétate de sodium pH 5, SDS 0,1 %, pour être extraite successivement par un volume de phénol saturé en H₂O, par un volume de phénol-chloroforme. La phase aqueuse est finalement amenée à 0,2 M en acétate de sodium pH 5 pour précipiter l'ARN par 2,5 volumes d'éthanol absolu à - 20°C pendant une nuit.

10 b) Purification des ARNs messagers :

On utilise la méthode de ARNEMANN et Al. [(1977), Nucl. Acids Res. 4, 4023-4026].

Cette méthode consiste à séparer les ARNs poly A+ de l'ARN total par 2 chromatographies successives sur oligo (dT) cellulose.

15 c) Traduction in vitro des ARNs m dans le lysat de réticulocytes de lapin /PELHAM et JACKSON, (1986), Eur. J. Biochem, 67, 247/.

Les ARNs m (0,5 µg) sont traduits dans 30 µl de lysat de réticulocytes (N-150 AMERSHAM), en présence 20 d'acétate de potassium (110 mM), d'acétate de magnésium (1mM), d'un cocktail d'aminoacides sans L-méthionine (50 mM) et de 50 µCi de ³⁵S méthionine (AMERSHAM).

d) Immunoprécipitation des produits de traduction

25 L'immunoprécipitation est réalisée comme décrit à l'Ex. 3-d) ci-dessus ; brièvement, après incubation de produits de traduction (60 000cpm) avec les sérums (10µl), les immunocomplexes sont adsorbés sur 10 mg de protéine A-Sépharose (Pharmacia), puis élus pour être analysés an SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970, NATURE, 227, 680).

30 **EXEMPLE 11 - Immunoprécipitation des produits de traduction d'ARNm de tachyzoïtes.**

Les ARNm sont préparés par la méthode décrite à l'Exemple 10 ci-dessus (pistes 1 et 3 de la figure 11 annexée) ou par la méthode de CHIRGIN et Al. [(1978) Biochemistry, 18, 5294-5299] (pistes 2 et 3 de la figure 11). Cette figure montre également les profils des produits de traduction immunoprécipités par le sérum humain de la phase chronique de l'infection (pistes 3 et 4).

Les produits de traduction 24 kD, 37 kD et 80 kD reconnus par les deux sérums sont indiqués par une flèche.

L'immunoprécipitation des produits de traduction par une série de sérums humains des phases chronique et aiguë est en outre représentée comparativement à la figure 12 annexée ; en particulier leur immunoprécipitation :

- par une série de sérums humains de la phase chronique (IgG) (pistes 1, 3, 4, 5, 6),
- par un sérum humain en fin de phase aiguë (IgG + IgM) (piste 2),
- par un sérum humain négatif (piste 7).

La reconnaissance des produits de traduction 24 kD et 37 kD par tous les sérums chroniques est symbolisée par une flèche. Ces deux antigènes ne sont pas reconnus par le sérum de la phase aiguë.

EXEMPLE 12 - Caractérisation de l'antigène 24 kD.

Mise en évidence de la nature protéique de l'antigène 24 kD.

Un extrait total de tachyzoïtes (extraction CHAPS) marqués par la méthionine ³⁵S a été adsorbé sur ConA-Sépharose ou sur WGA-Ultrogel. L'extrait de départ ainsi que les éluats des deux lectines ont été immunoprécipités par un sérum de lapin anti-ES.

Les résultats obtenus sont représentés à la figure 10A annexée.

Aucun antigène marqué par la méthionine ³⁵S n'a été retenu sur WGA.

Piste 1 : Immunoprécipité de l'extrait total de tachyzoïtes,

Piste 2 : Immunoprécipité de l'éluat ConA-Sépharose.

Certains antigènes (notamment ceux de masse environ 170 kD, 39 kD et 25 KD) ont des groupements glycosylés qui se fixent à la Concanavaline A. L'antigène 24 kD n'est pas contre pas retenu.

Figure 10B : cette figure met en évidence l'identité de masse moléculaire entre l'antigène ES de 24 kD et le produit de traduction majeur des ARNm de tachyzoïtes.

Piste 1 : Immunoprécipitation d'antigènes ES marqués par la méthionine ³⁵S, par un sérum de souris anti-ES.

Piste 2 : Immunoprécipitation des produits de traduction marqués par la méthionine ³⁵S par un sérum de lapin anti-ES.

Etant donné d'une part la nature protéique de l'antigène 24 kD (Fig. 10A) et, d'autre part, sa migration

voisine de celle du produit de traduction, l'identité des deux molécules est fortement présumée.

EXAMPLE 13 - Immunocompétition entre les produits de traduction du tachyzoïte et l'antigène bradyzoïte extrait au SDS 2 % vis-à-vis d'un sérum de lapin anti-ES.

Cette Immunocompétition est représentée à la figure 13 annexée dans laquelle :
- la piste 1 : Immunoprecipitation des produits de traduction en présence de 50 µg d'extrait de bradyzoïtes.
- la piste 2 : Immunoprecipitation des produits de traduction en présence de 50 µg d'extrait de *S. mansoni*.
- la piste 3 : Immunoprecipitation des produits de traduction seuls.

L'antigène bradyzoïte est capable de diminuer la fixation des produits de traduction 24 KD et 37 KD par des anticorps anti-ES.

D'autre part, une étude à visée diagnostique a été réalisée à l'aide d'une sérothèque de 350 sérums bien caractérisés dont certains ont été prélevés au cours des différentes phases de la toxoplasmose et montrent une séroconversion ; d'autres, plus tardifs, permettent le suivi de la réponse anticorps ; d'autres encore, correspondant à des "couples" maman-bébé, ont été prélevés pendant les périodes pré-, péri- et post-natales.

L'immunoprecipitation par ces sérums des antigènes ES (marqués par la méthionine ^{35}S) a permis d'établir la cinétique d'apparition des anticorps et de mettre notamment en évidence :

- que les sérums de phase aiguë (IgM) reconnaissent les antigènes ES de façon beaucoup plus intense que les antigènes somatiques ou membranaires ;
- que deux antigènes ES, de masse environ 98000 et 68000, reconnus de façon majeure et très précoce, pourraient être utilisés comme marqueurs de séroconversion ;
- que d'autres antigènes, reconnus de façon beaucoup plus tardive, notamment celui de masse 24000, semblent au contraire constituer de réels marqueurs de l'immunité dans la toxoplasmose.

Cet antigène de masse 24000, qui ne semble pas glycosylé (pas de fixation sur la Concanavaline A et la WGA) semble correspondre au produit de traduction d'ARN de tachyzoïtes de masse 24. Ce produit de traduction est en effet également immunoprecipité par les sérums tardifs d'infection humaine et non par les sérums précoces (IgM + IgG).

EXEMPLE 14 - Clonage des produits de traduction.

a) Préparation de la banque d'ADNc à partie de l'ARNm de tachyzoïtes

La synthèse de l'ADNc est réalisée selon la méthode de GUBLER et HOFFMAN [(1983) GENE, 25, 263]. Le premier brin d'ADN complémentaire est synthétisé par l'action de la transcriptase reverse de AMV. L'ADN, rendu double brin par l'action conjointe de la RNase H et de la polymérase I, est ensuite traité à la T₄ DNA polymérase pour rendre ses extrémités franches. Après méthylation par l'enzyme EcoRI méthylase, on ajoute des "linkers" EcoRI aux extrémités des ADNc par l'action de la T4 DNA ligase. Les ADNc sont ensuite digérés par l'enzyme EcoRI et sont purifiés par chromatographie sur une colonne ACA34 (0,2 x 0,30 cm) [WATSON, C.J. et JACKSON, J.F. (1985) In Glover DM ed. : "DNA cloning" vol. I. A practical approach : Oxford, Washington : IRL Press, p. 49]. On insère ensuite les ADNc (500 à 7000 pb) dans le site EcoRI du phage GT11 [HUYNH et Al.; (1985) In Glover D.M., ed. "DNA Cloning" vol. I. A practical approach : Oxford, Washington : IRL Press, P. 49].

Après ligation, les phages recombinants sont empaquetés in vitro. Une banque de 3×10^6 phages est ainsi constituée.

b) Criblage de la banque et sélection des candidats "ES"

Le dérivé du phage λ . GT11 permet l'expression de gènes étrangers sous le contrôle du promoteur Lac, après fusion de l'ADNc avec le gène de la β -galactosidase de *E. coli* (Young and Davis, 1983).

Un échantillon de la banque en λ .GT11 est inoculé sur la souche de *E. coli* Y1090 à une dilution représentant 1.10^4 phages/boîte de 90 mm de diamètre.

L'induction de l'expression de la protéine sous contrôle du promoteur Lac est déclenchée à 42°C en présence d'isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG).

Les protéines synthétisées sont absorbées sur filtre de nitrocellulose pour être incubées en présence d'anticorps de lapin anti-ES (obtenus comme décrit à l'Ex. 3.a) ci-dessus).

Les anticorps fixés sont détectés par un second anticorps anti-IgG de lapin marqué à la peroxydase ; ce complexe est ensuite révélé par une coloration avec le 4 chloro-1-naphtol en présence de H₂O₂.

Cette détection permet d'identifier les phages recombinants dont l'insertion d'ADNc dirige la synthèse d'une protéine ou fraction de protéine portant les épitopes reconnus par les anticorps anti-ES.

Une première sélection a conduit à l'isolement de 100 clones (ES). Après purification, 20 d'entre eux ont été recréés différemment par deux sérum humains (voir figure 7) : un sérum IgG₁₈ reconnaissant les produits de traduction de 24 et 37 kD ; l'autre IgG₂₀ ne les reconnaissant pas. 3 clones ES8, ES10 et ES11 sont isolés pour leur reconnaissance par le sérum IgG₁₈.

5

10

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

c) Caractérisation des clones ES8, ES10, ES11 par sélection d'anticorps

La méthode de sélection d'anticorps utilisée est celle décrite par Olmsted (1981), J. BIOL. CHEM., 226, 11955.) Un échantillon de chaque clone est inoculé sur la souche Y1090 de E. coli à raison de 10^4 à 10^5 phages/boîte de 90 mm de diamètre.

L'induction de l'expression est réalisée à 42°C, en présence d'IPTG et les protéines synthétisées sont absorbées sur filtres de nitrate de cellulose. Les filtres sont incubés avec un sérum de lapin anti-ES (1/125) pendant 3 heures à la température ambiante.

Après 3 lavages, les anticorps fixés spécifiquement aux protéines de fusion sont décrochés en présence de tampon glycocolle-HCl pH 2,8 ; 0,1 M ; NaCl 0,15 M pendant 3 minutes.

La solution est rapidement neutralisée par du Tris 1M.

Les anticorps sélectionnés sont concentrés sur 10 mg de protéine A-Sépharose (Pharmacia) et utilisés pour l'immunoprecipitation des produits de traduction. Les anticorps sélectionnés par les protéines de fusion des 3 clones reconnaissent le produit de traduction 24 kD, ainsi que cela ressort de la figure 14 annexée qui représente l'immunoprotection des produits de traduction par des anticorps sélectionnés par les clones ES8, ES10 et ES11.

Piste 1 : Anticorps d'un sérum de lapin anti-ES sélectionnés par le clone ES11.
Piste 2 : Anticorps d'un sérum de lapin hyperimmun sélectionnés par le clone ES11.
Piste 3 : Anticorps d'un sérum de lapin anti-ES sélectionnés par le clone ES10.
Piste 4 : Anticorps d'un sérum de lapin anti-ES sélectionnés par le clone ES-8.

EXEMPLE 15 - Sous-clonage des "inserts" des clones ES 8, 10 11 dans le vecteur pUC13

1) Obtention de l'ADN phagique (λ GT11)

Les bactériophages correspondant à chacun des clones sont adsorbés sur E. coli Y1090 20 minutes à température ambiante. L'incubat est ensuite étalé sur des boîtes d'agarose en présence d'ampicilline (à raison de 20.000 pfU/boîte). Après une nuit à 37°C, les bactériophages sont élusés dans ddu SM (NaCl 100 mM ; MgSO₄ 7H₂O 8mM ; Tris 50 mM pH 7,5 ; Gélatine 0,01 %).

L'éluat est d'abord traité au chloroforme puis par de la DNAase de la RNAase (1 µg/ml) pour éliminer les constituants bactériens.

Les phages sont ensuite précipités dans du PEG 10 % et NaCl 1,25 M à 4°C.

Une ultracentrifugation à l'équilibre en gradient de CsCl est effectuée pendant 24 heures à 108.000 g (Beckman L8 70 rotor SW 55 Ti).

La bande phagique est récupérée à l'aide d'une aiguille de la solution de phages est dialysée deux fois pendant 1 heure contre du Tampon Tris 10 mM pH 7,4 ; MgCl₂ 20 mM NaCl 0,15 M. L'ADN phagique est ensuite obtenu par traitement au Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM et SDS 0,1 % et purifié par une extraction au phénol/chloroforme. Les "inserts" sont ensuite séparés de l'ADN phagique par une digestion EcoRI et migration sur gel d'agarose à bas point de fusion 1,2 %. Après coloration du gel dans une solution de bromure d'éthidium (10 µg/ml), les fragments de digestion, sont visualisés aux ultraviolets. On peut ainsi déterminer selon la distance de migration la taille des différents "inserts" : l'insert ES8 est de 900 paires de bases, l'insert ES10 est de 1900 paires de bases, l'insert ES11 est de 1300 paires de bases.

Les "inserts" sont ensuite extraits de l'agarose par la technique du "GENECLEAN" (Biol01).

2) Sous-clonage dans pUC13

Le plasmide pUC13 (PHARMACIA) linéarisé par digestion EcoRI possède des extrémités 5'phosphorylées pour minimiser la recirculation du plasmide. La réaction de ligation entre le pUC13 et l'insert est effectuée en utilisant 1 unité d'ADN ligase du phage T4 (Genofit). Le rapport molaire vecteur/insert doit être de l'ordre de 1. Le mélange de ligation est ensuite utilisé pour la transformation de la souche E. coli JM103, selon la méthode classique de HANAHAN /J. Mol. Biol., (1983), 166, 553/. Les cellules transformées sont étalées sur des boîtes de LB agar en présence d'ampicilline, de XGal et d'IPTG. Les colonies blanches sont celles qui ont intégré les plasmides recombinants.

Pour chacun des clones ES8, ES10 et ES11, nous avons sélectionné une colonie blanche : pUC13, ES8.10, ES10.2, ES 11.7. Carte de restriction des 3 clones pUC13 ES 8.10, ES 10.2, ES 11.7.

Les plasmides recombinants qui dirigent la synthèse de l'antigène 24 KD ont été déposés sous les N° I-675, I-676 et I-677 en date du 16 Juillet 1987 auprès de la CNCM.

1) Préparation de l'ADN plasmidique

Cette étape permet de séparer l'ADN plasmidique de l'ADN bactérien. Elle est réalisée par centrifugation en gradient isopycnique de CsCl selon la méthode de BULHER et TREICH (telle que mise en œuvre au Service de Biochimie).

2) Digestion par les endonucléases

L'ADN plasmidique purifié est ensuite digéré par différentes enzymes de restriction (EcoRI, AccI, PstI, PvUll et SaCl). Après analyse des fragments de digestion sur gel d'agarose 1,2 %, les cartes de restriction des trois inserts ont été établies et représentées à la figure 15 annexée qui montre le sous-clonage des inserts des 3 clones de TG, ES 8.10 (900 pb), ES 10.2 (1900 pb), ES 11.7 (1300 pb) dans le site EcoRI du vecteur plasmidique pUC13 (2700 pb).

Dans cette figure, A = AccI, E = EcoRI, P = PstI, Pv = PvUll, S = SaCl.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en œuvre de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse un contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarte du cadre, ni de la portée de la présente invention.

5

10

15

Revendications

1°) Antigènes de Toxoplasma gondii (TG) caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des antigènes d'excrétion-sécrétion (ES) des tachyzoïtes de TG.

20

2°C) Antigènes ES isolés des tachyzoïtes, selon la Revendication 1, caractérisés en ce qu'ils constituent un groupe d'antigènes dont les 20 majeurs qui ont été détectés, présentent des poids moléculaires respectifs de 185KD, 170KD, 155KD, 105KD, 98KD, 84KD, 68KD, 57KD, 53KD; 45KD, 43KD, 39KD, 35KD, 34KD, 31KD, 30KD, 26KD, 25KD, 24KD et 20KD environ.

25

3°) Antigènes ES selon la Revendication 2, caractérisés en ce que les antigènes de poids moléculaires 185KD, 170KD, 155KD, 105KD, 57KD, 53KD, 45KD, 43KD, 39KD, 35KD, 34KD, 31KD, 30KD, 26KD, 25KD et 24KD sont reconnus au cours de la phase chronique.

4°) Antigène ES selon la Revendication 2, caractérisé en ce que l'antigène de poids moléculaire 105KD est identifié comme un marqueur de la phase chronique.

30

5°) Antigène ES selon la Revendication 2, caractérisé en ce que l'antigène de poids moléculaire 84KD est identifié comme un marqueur transitoire de la phase chronique.

6°) Antigène ES selon la Revendication 2, caractérisé en ce que l'antigène de poids moléculaire 24KD est identifié comme un marqueur tardif de la phase chronique, également marqueur d'immunité protectrice.

35

7°) Antigène ES selon la Revendication 2, caractérisé en ce que l'antigène de poids moléculaire 98 KD est identifié comme un marqueur de la phase aiguë.

8°) Antigène ES selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'antigène de poids moléculaire 68 KD est identifié comme un marqueur de la phase aiguë, cependant moins spécifique que l'antigène 98 KD.

40

9°) Antigènes selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisés en ce qu'ils sont isolés de surnageants recueillis après incubation d'une suspension de tachyzoïtes de Toxoplasma gondii pendant environ 3 heures dans un milieu RPMI 1640 contenant 10 % de sérum décomplémenté d'origine humaine ou animale, et centrifugation, puis ultrafiltration des surnageants recueillis, éventuellement suivie d'une étape de concentration et d'une nouvelle étape de centrifugation, ainsi que d'un traitement de congélation à -70°C, lesquels antigènes ES sont capables d'induire une réponse humorale protectrice contre la toxoplasmose.

45

10°) Antigènes de TG caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des antigènes des bradyzoïtes de Toxoplasma gondii.

11°) Antigènes de TG selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des antigènes communs aux tachyzoïtes et aux bradyzoïtes de Toxoplasma gondii.

50

12°) Antigène selon la revendication 11, caractérisé par son poids moléculaire d'environ 43 KD, par le fait qu'il est de nature glycoprotéique et par le fait qu'il est reconnu par des sérum anti-ES, par des sérum de souris anti-bradyzoïtes et par des sérum humains prélevés chez des malades.

13°) Antigène selon la revendication 11, caractérisé par un poids moléculaire d'environ 25KD-24KD et par le fait que sa localisation dans les tachyzoïtes est confirmée par immunoprécipitation par les sérum anti-bradyzoïtes.

55

14°) Antigènes selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, caractérisés en ce qu'ils sont identifiés par immunoprécipitation de sérum de mammifères, notamment de sérum humain ou animaux, reconnus comme séropositifs (soit de phage aiguë contenant des IgM spécifiques, soit de phase subaiguë contenant à la fois des IgM et des IgG, soit de phase chronique contenant des IgG), par des antigènes de tachyzoïtes et de bradyzoïtes et/ou le cas échéant par des produits de traduction de ces antigènes, de préférence préalablement radiomarqués, puis dissociation des immunoprécipités formés, suivie d'une électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE), d'une autoradiographie des gels et de leur révélation.

60

15°) Antigènes de TG selon l'une quelconque des revendications 10 à 14, caractérisés en ce qu'ils sont isolés de kystes récupérés de broyats de tissus de mammifères, tels que souris notamment, infectés par la forme chronique de Toxoplasma gondii, lesquels kystes sont purifiés sur un gradient approprié, soniqués puis broyés à l'état congelé et centrifugés pour recueillir un surnageant contenant les antigènes cytoplasmiques

65

(fraction S₁) et le culot dont on libère les antigènes membranaires (fraction S₂) à l'aide d'un détergent approprié.

16°) Produits de traduction d'ARNm de tachyzoïtes caractérisés en ce qu'ils portent les épitopes reconnus par les antigènes ES de *Toxoplasma gondii*.

5 17°) Produits de traduction d'ARNm de tachyzoïtes caractérisées en ce qu'ils sont obtenus par précipitation d'ARN à partir de lysats de tachyzoïtes centrifugés dont le culot est extrait par des agents d'extraction appropriés pour précipiter l'ARN, purification des ARN messagers par séparation des ARN poly A+ de l'ARN total par chromatographie, puis traduction in vitro des ARNm dans du lysat de réticulocytes en présence d'un mélange d'amino-acides dépourvu de L-méthionine et comprenant la ³⁵S-méthionine, en milieu tamponné, et synthèse d'ADNc à partie de l'ARNm de tachyzoïtes précédemment obtenu, par action de la transcriptase réverse d'AMV, la banque d'ADNc ainsi formée ensuite criblée pour identifier les phages recombinants dont l'insertion d'ADNc dirige la synthèse d'une protéine ou fraction de protéine portant les épitopes reconnus par les anticorps anti-ES et y sélectionner les clones ES reconnus par des sérums humains, les clones retenus étant caractérisés par sélection d'anticorps.

15 18°) Sérum riches en anticorps IgE propres à conférer une protection significative contre la toxoplasmose et en particulier contre les tachyzoïtes, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus à partie d'animaux immunisés par des antigènes ES selon l'une quelconque des revendications 1 à 17.

19°) Anticorps monoclonaux caractérisés en ce qu'ils sont produits par des cultures d'hybridomes résultant de la fusion de cellules d'animaux immunisés par les antigènes ES, avec des cellules tumorales.

20 20°) Vaccins propres à procurer une protection significative contre la toxoplasmose, caractérisés en ce qu'ils contiennent en tant que constituant actif des anticorps polyclonaux ou monoclonaux anti-ES, selon l'une quelconque des Revendications 1 à 17.

25 21°) Compositions thérapeutiques pour le traitement de la toxoplasmose, caractérisées en ce qu'elles contiennent en tant que constituant actif, des antigènes ES selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, et plus particulièrement des antigènes ES présentant des épitopes et des déterminants communs aux tachyzoïtes et aux bradyzoïtes.

22°) Produits de diagnostic de la toxoplasmose, y compris de la toxoplasmose congénitale, caractérisés en ce qu'ils contiennent en tant que constituants actifs, des antigènes ES selon l'une quelconque des revendications 1 à 17.

30 23°) Vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il contient un inserat d'ADNc de tachyzoïtes qui dirige la synthèse d'une protéine ou d'une fraction de protéine portant un ou des épitopes reconnus par les anticorps anti-ES.

24°) Vecteur recombinant selon la revendication 23, caractérisé en ce qu'il porte l'information génétique nécessaire à la synthèse d'une protéine ou d'une fraction de protéine portant un ou des épitopes reconnus par les anticorps anti-ES, selon l'une quelconque des revendications 1 à 17.

35 25°) Plasmides recombinants selon la revendication 24, caractérisés en ce qu'ils dirigent la synthèse de l'antigène 24 KD et ont été déposés sous les N° I-675, I-676 et I-677 en date du 16 Juillet 1987 auprès de la CNCM.

26°) Plasmides recombinants selon la Revendication 25 reconnus par des sérums humains contenant des IgG, isolés par criblage et sélection par des moyens appropriés.

40 27°) Produit de diagnostic selon la revendication 22, caractérisé en ce qu'il comprend l'antigène ES 105 KD pour le marquage de la phase chronique d'une infection par TG.

28°) Produit de diagnostic selon la revendication 22, caractérisé en ce qu'il comprend l'antigène ES 98 KD pour le marquage de la phage aiguë d'une infection par TG.

45 29°) Produit de diagnostic selon la revendication 22, caractérisé en ce qu'il comprend l'antigène ES 24 KD pour le marquage de l'immunité protectrice.

50

55

60

65

0301961

FIG.1

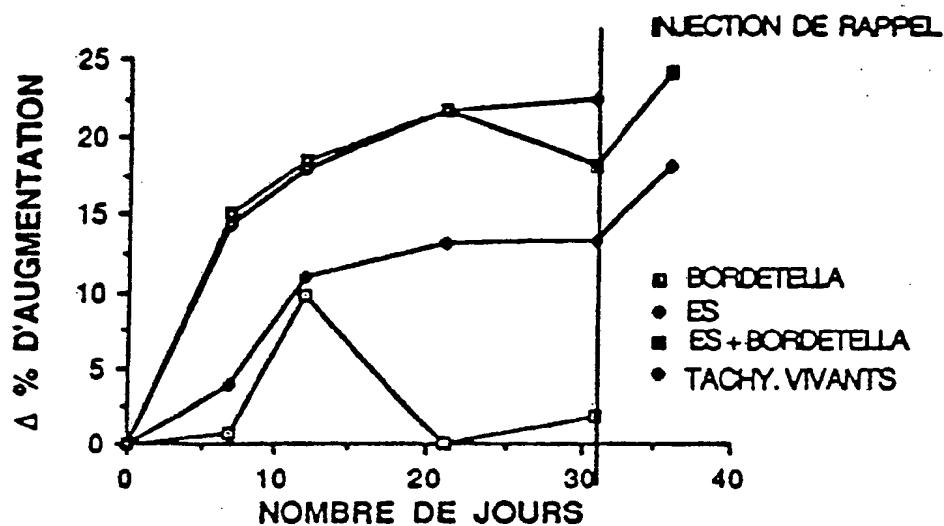


FIG.2

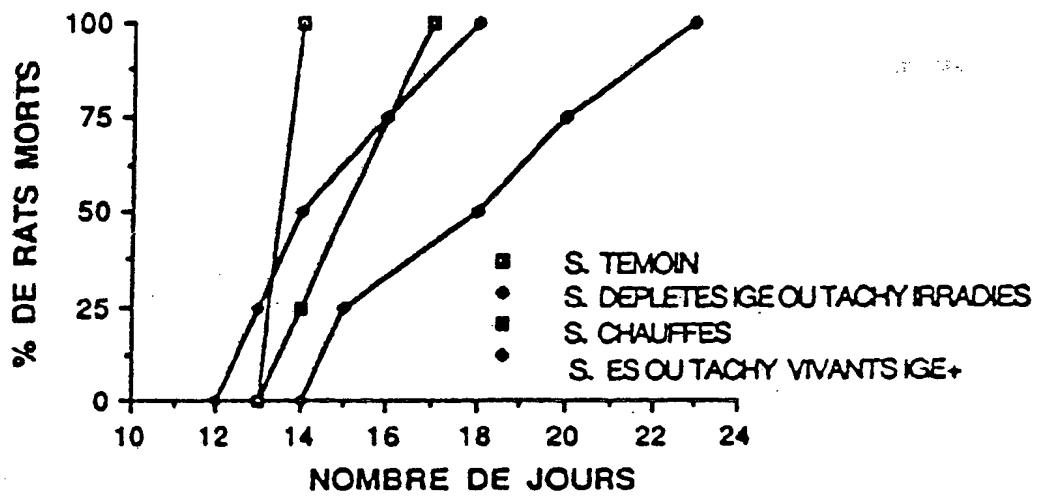
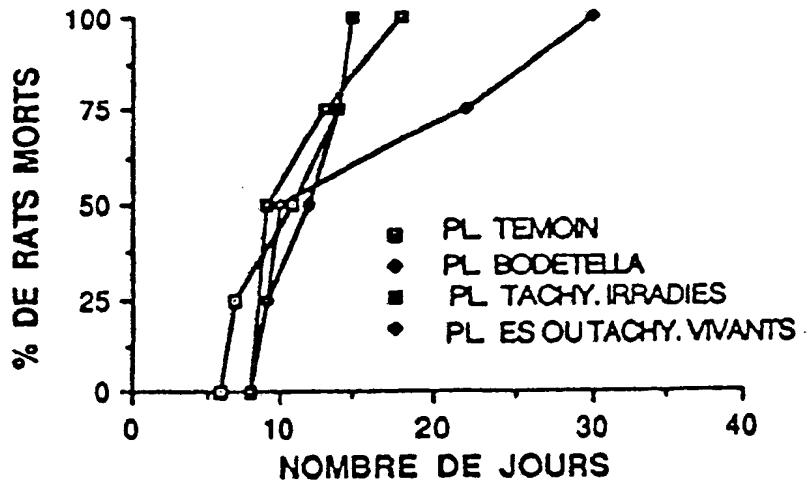


FIG.3



0301961

FIG. 4

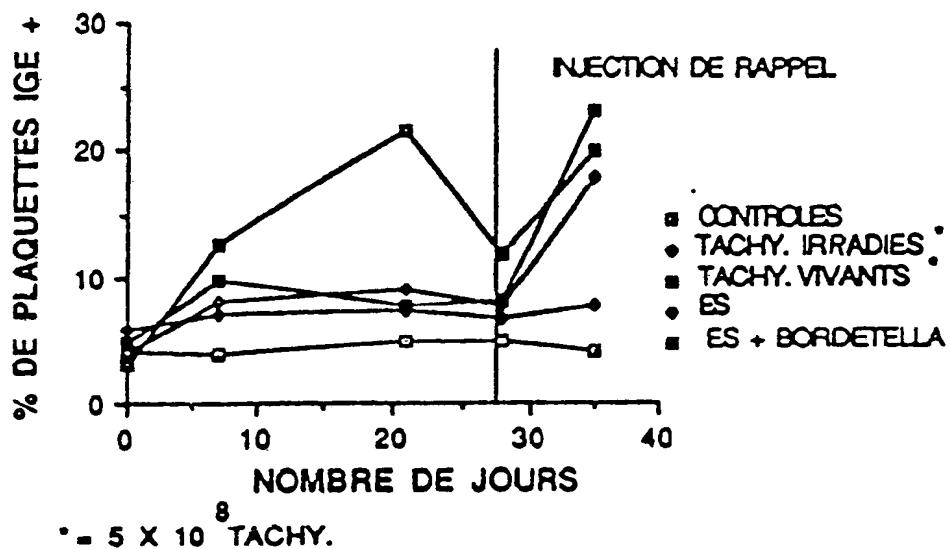
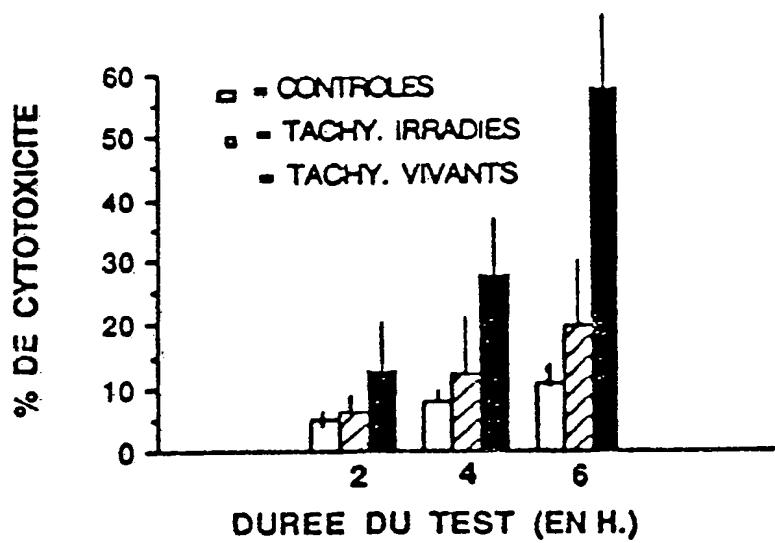
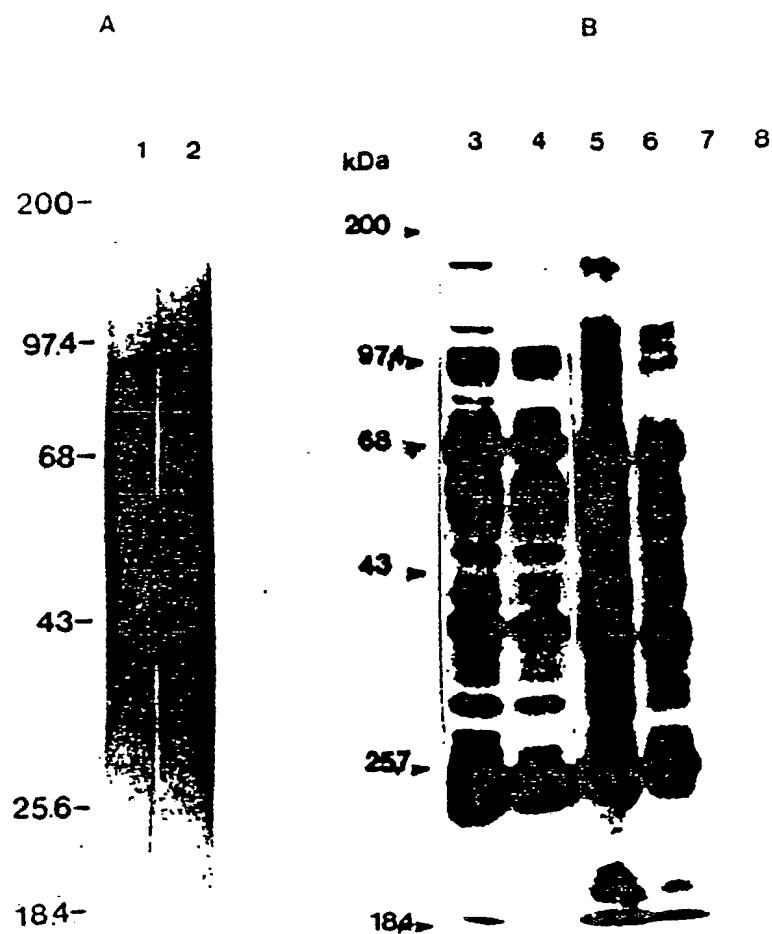


FIG. 5



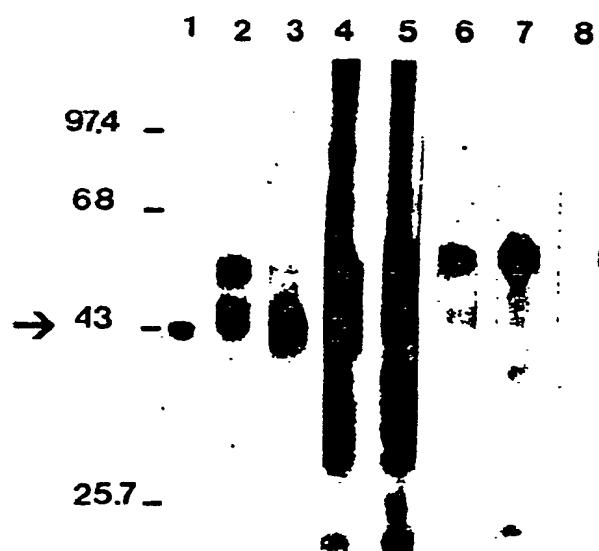
0301961

FIG. 6



0301961

FIG. 7



0301961

FIG. 8

2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

974-

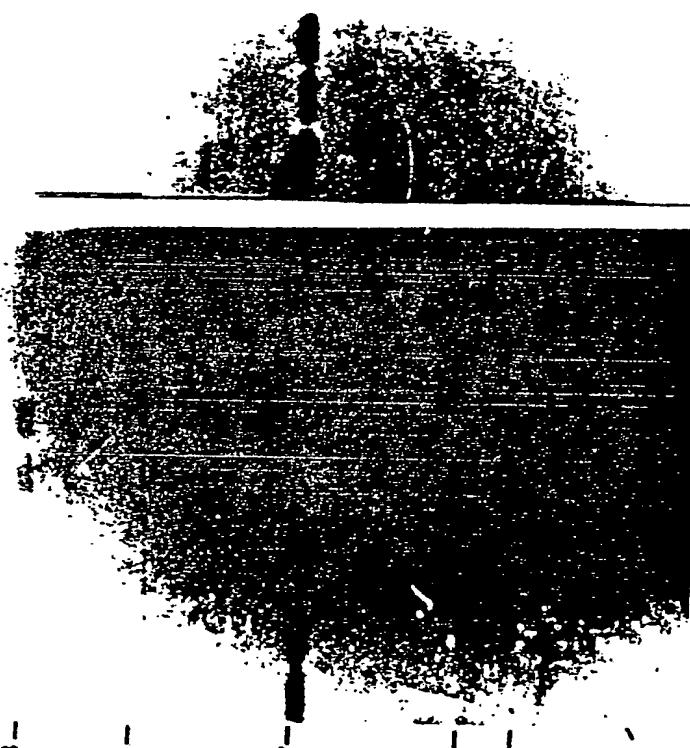
68-

43-

→ 257-

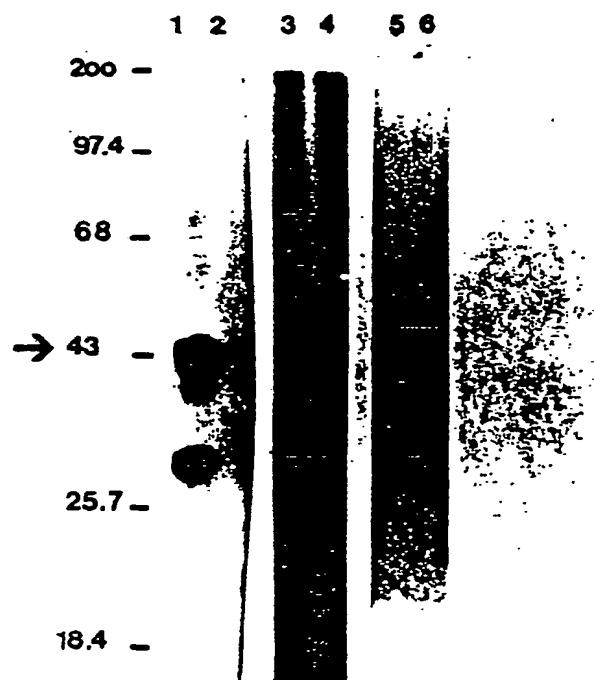
184-

143-



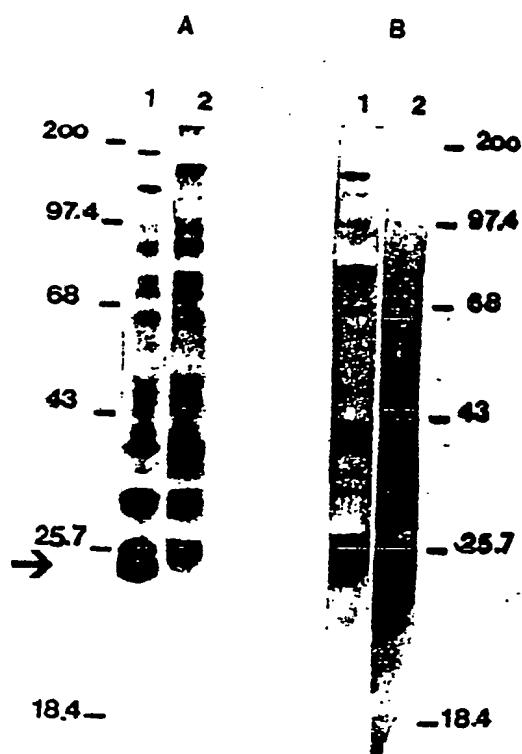
0301961

FIG. 9



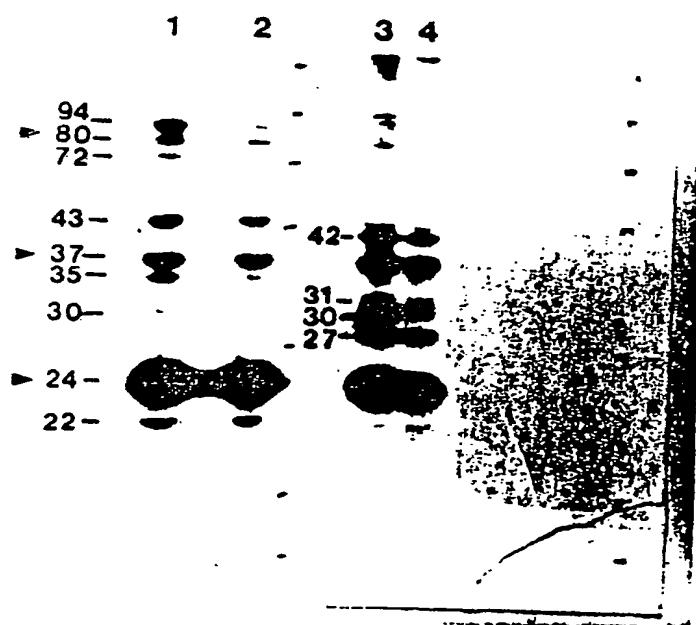
0301961

FIG. 10



0301961

FIG. 11



0301961

FIG. 12

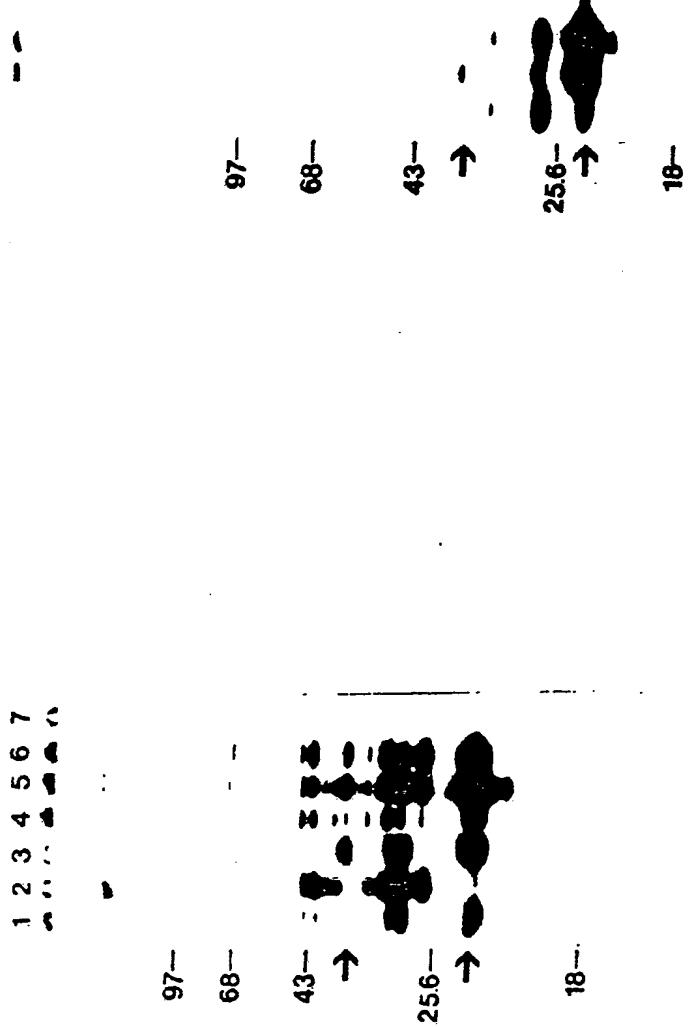
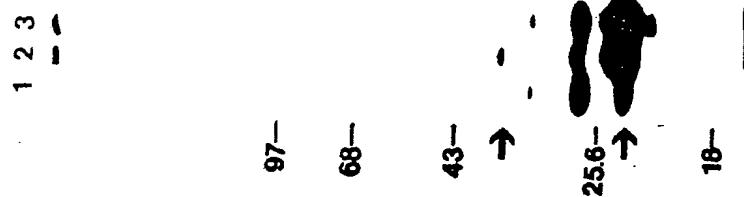


FIG. 13



0301961

FIG. 14

- 1 2 3 4

97 -

68 -

43 -

25.6 -

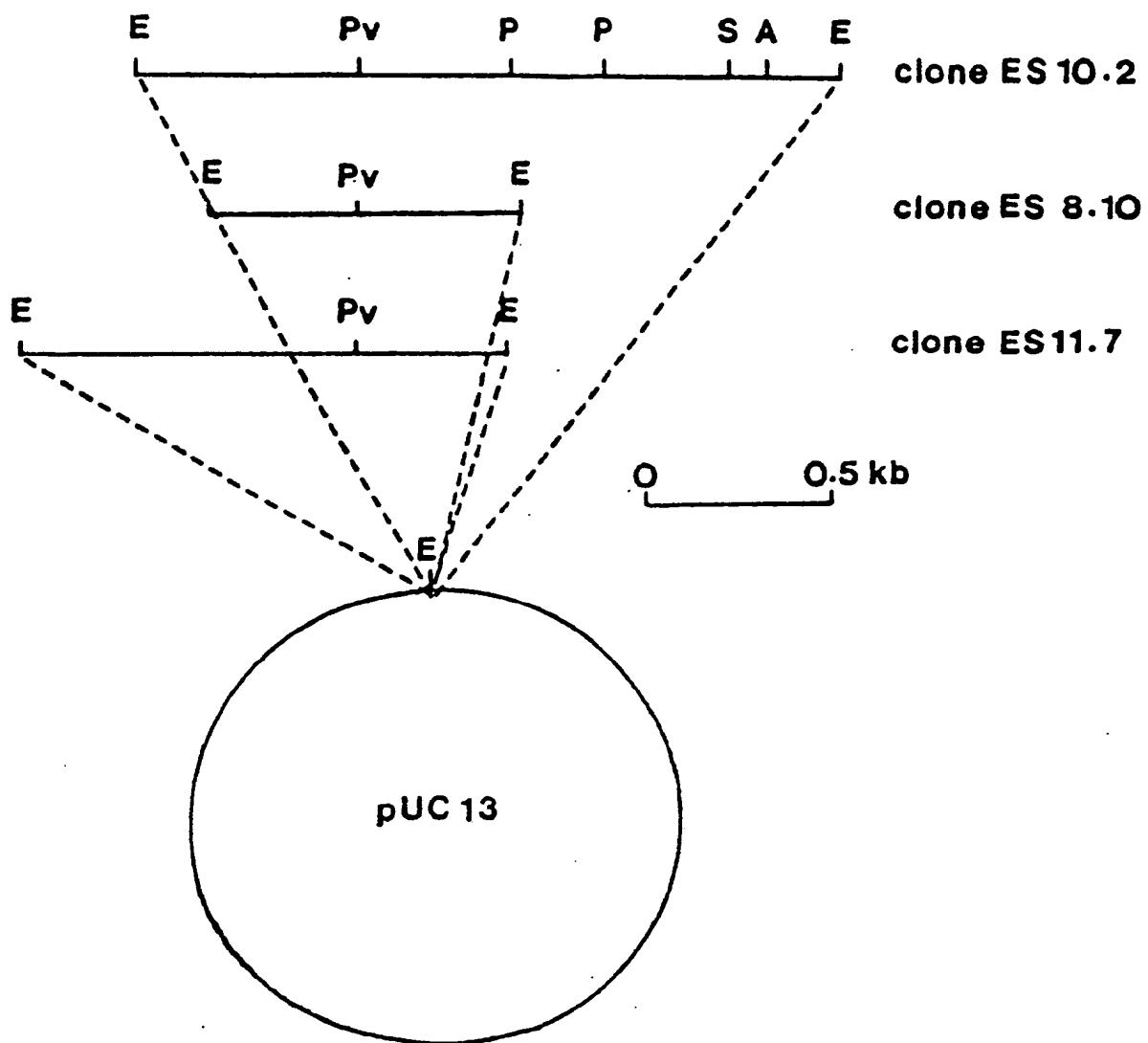


18 -

14 -

0301961

FIG.15



EP 88 40 1948

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
			DOMAINE TECHNIQUE RECHERCHE (Int. Cl.4)
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 103, no. 25, 23 décembre 1985, page 704, résumé no. 212972p, Columbus, Ohio, US; J.B. PRINCE et al.: "Cell free synthesis of toxoplasma gondii antigens", & MOL. BIOCHEM. PARASITOL. 1985, 17(2), 163-70 * Résumé *	25	A 61 K 39/002 C 12 N 15/00 A 61 K 39/395 C 12 P 21/00 G 01 N 33/569
Y	IDEM ---	16, 17, 23, 26	
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 104, no. 21, 26 mai 1986, page 225, résumé no. 181833h, Columbus, Ohio, US; A.M. JOHNSON et al.: "Characterization and in vitro translation of toxoplasma gondii ribonucleic acid", & MOL. BIOCHEM. PARASITOL. 1986, 18(3), 313-20 * Résumé *	16, 17, 23, 26	
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 105, no. 15, 13 octobre 1986, page 491, résumé no. 131792u, Columbus, Ohio, US; C. ROQUES et al.: "Preliminary immunochemical study on somatic antigens and exoantigens in toxoplasma gondii", & BULL. SOC. FR. PARASITOL. 1984, (3), 31-4 * Résumé *	1-3	A 61 K C 12 N
	---	-/-	
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lien de la recherche	Date d'achèvement de la recherche	Examinateur	
LA HAYE	19-09-1988	TURMO Y BLANCO C.E.	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul	T : théorie ou principe à la base de l'invention		
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie	E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date		
A : arrière-plan technologique	D : cité dans la demande		
O : divulgation non-écrite	L : cité pour d'autres raisons		
P : document intercalaire	& : membre de la même famille, document correspondant		



EP 88 40 1948

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 107, no. 3, 20 juillet 1987, page 459, résumé no. 21635d, Columbus, Ohio, US; C. ROQUES et al.: "Immunochemical characterization of the exo-antigenic proteins from different strains of toxoplasma gondii", & BULL. SOC. FR. PARASITOL. 1986, 4(1), 79-84 * Résumé * ---	1-3	
Y	FR-A-2 564 731 (AMBROISE-THOMAS) * Page 8, lignes 29-36; revendications * ---	1-3,22	
Y	EP-A-0 082 745 (INSTITUT MERIEUX) * Revendications * ---	22	
A,D	THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 132, no. 1, janvier 1984, pages 443-449, The American Association of Immunologists; L.H. KASPER et al.: "Identification of stage-specific sporozoite antigens of toxoplasma gondii by monoclonal antibodies". ---		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4)
A,D	THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 124, no. 6, juin 1980, pages 2578-2583, The Williams & Wilkins Co.; E. HANDMAN et al.: "Detection and characterization of membrane antigens of toxoplasma gondii" ---	-/-	
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE	Date d'achèvement de la recherche 19-09-1988	Examinateur TURMO Y BLANCO C.E.	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire	T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Page 3

Numéro de la demande

EP 88 40 1948

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
A	<p>THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 134, no. 5, mai 1985, pages 3426-3431, The American Association of Immunologists; L.H. KASPER et al.: "An unexpected response to vaccination with a purified major membrane tachyzoite antigen (P30) of toxoplasma gondii"</p> <p>---</p>		
A	<p>LYON MEDICAL, vol. 243, no. 12, 1980, pages 737-740; P.T. DESGEORGES et al.: "Mise en évidence et cinétique d'apparition d'exo-antigènes produits par toxoplasma gondii en culture in vitro"</p> <p>-----</p>		
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4)
<p>Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications</p>			
Lieu de la recherche	Date d'achèvement de la recherche	Examinateur	
LA HAYE	19-09-1988	TURMO Y BLANCO C.E.	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>	
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>			

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

This Page Blank (uspto)